

RENATA SESTI COSTA

Efeito do estresse agudo pelo frio na fagocitose de timócitos apoptóticos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica
e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo
Mantovani.

Órgãos financiadores:
CNPq, FAPESP e FAEPA

Ribeirão Preto
2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Sesti-Costa, R

Efeito do estresse agudo pelo frio na fagocitose de timócitos apoptóticos.
97p.:il.;30cm.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Mantovani

1. Neuroimunomodulação, 2. Fagocitose, 3. Macrófagos, 4. Apoptose

Dedico este trabalho:

*Ao meu namorado José Luiz
Por estar sempre ao meu lado, mesmo nas horas mais difíceis.*

*Aos meus pais
Por acreditarem e investirem em mim todo este tempo.*

*À Lúcia e José Luiz,
Cujo apoio foi fundamental para que este trabalho se realizasse.*

A todos que diretamente e indiretamente contribuíram neste estudo.

AGRADECIMENTOS:

Os meus sinceros agradecimentos:

Ao Dr. Bernardo Mantovani, pela criteriosa orientação, por sua dedicação ao trabalho e à minha aprendizagem e pela grandiosa lição de vida.

Aos professores Dr. Renato. H. Migliorini, Dra. Isis. C. Kettelhut e Dr. José Antunes Rodrigues, por cederem seus laboratórios para a realização das dosagens hormonais.

Ao professor Dr. Fernando de Queiroz Cunha, pela ajuda na dosagem de citocinas.

Aos professores da pós-graduação, responsáveis pela minha formação.

Aos funcionários da FMRP, em especial os do biotério central, ao Júlio do biotério de animais especiais e Paulinho do biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia.

À Ana, pela ajuda, dedicação e amizade.

À Giu, Antonieta, Marina e Val pela paciência e apoio técnico.

A todos que me auxiliaram na realização de alguns experimentos: Cacilda, Zuléica, Nayara, prof. Cláudio, Beto e em especial Dorlei pela eficiente ajuda na esterilização do material.

Aos meus amigos do laboratório: Gyselle, Zé Antônio, Silvana, Larissa e Mirian, pela amizade, ajuda e excelente convívio.

Ao CNPq, FAPESP e FAEPA, pelo financiamento.

A todos os meus amigos da pós-graduação e em especial àqueles com os quais passei por várias etapas difíceis: Marina, Lizandra, Luciana, André, Luiz Otávio, Beraba, Priscila, Nalu, Mirela, Trança, Karen, Vanessa, Aninha, Natália, Giovana, Emiliana, Cacá.

Aos velhos amigos: Fabiana, Patrícia, Gustavo, Lisa, Carol, Marina, Camila, Juliana, Adolfo, Fabíola, Leandro entre outros, pela amizade e noites de companheirismo.

Aos amigos de algumas quintas de madrugada: Zé, Humberto, Carioca, Gabriel, Wimbe, Alcir, André, Trança, Lenaldo, Priscila, Nelson, Gustavo, Dã, Doidinho e Smoo, pela diversão na hora em que os problemas precisavam ser esquecidos.

Ao meu namorado José Luiz, pela paciência, carinho e apoio em todas as horas.

Aos meus pais e ao meu irmão, por todos esses anos de amizade, apoio, confiança e aprendizado e por algumas vezes deixarem seus sonhos de lado para se dedicarem ao meu.

À Lúcia e José Luiz, por me acolherem com tanto carinho em sua casa e pelo apoio fundamental para que este trabalho pudesse existir.

“O único modo de evitar os erros é adquirindo experiência; mas a única maneira de adquirir experiência é cometendo erros”
(autor desconhecido)

“São fúteis e cheias de erros as ciências que não nasceram da experimentação, mãe de todo conhecimento”
(Leonardo da Vinci)

“Nada há de mais poderoso do que uma idéia que chegou no tempo certo”
(Victor Hugo)

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”
(John Kennedy)

RESUMO

Evidências mostram uma íntima relação entre o estresse e a ocorrência de variações na função imune tanto em modelos animais quanto em humanos, sendo sugerido em alguns trabalhos uma imunossupressão induzida pelo estresse, enquanto em outros foi revelado um aumento da função imune. Neste estudo, verificamos os efeitos do estresse e a ação dos principais hormônios envolvidos com esse mecanismo na fagocitose de células apoptóticas. Observamos que o estresse hiperagudo pelo frio (-15°C por 10 minutos) não alterou a capacidade fagocítica e a interação com timócitos apoptóticos nem de macrófagos peritoneais murinos não ativados, nem de macrófagos ativados com LPS. O estresse agudo (4°C por 4 horas) também não alterou a porcentagem de fagocitose e de interação de timócitos apoptóticos com macrófagos não ativados, porém, provocou uma diminuição na capacidade de fagocitose por macrófagos ativados com LPS. Este mesmo efeito foi observado em experimentos *in vitro*, nos quais corticosterona foi incubada com os macrófagos ativados em concentrações similares àsquelas observadas no plasma após o estresse agudo pelo frio. Outros hormônios como epinefrina e norepinefrina não tiveram efeito *in vitro*, o que mostra que esta inibição da fagocitose induzida pelo estresse agudo foi devido, ao menos em parte, à corticosterona. Considerando as possíveis implicações fisiológicas desses resultados, podemos notar que a diminuição na fagocitose de células apoptóticas poderia resultar na sua progressão para estágios mais avançados de morte celular, o que deve contribuir para o desenvolvimento de inflamação e o aumentado risco de autoimunidade. O comportamento diferente entre macrófagos normais e ativados é discutido em relação ao possível efeito da tolerização ou “priming” dos linfócitos T no desenvolvimento de reações autoimunes.

ABSTRACT

Previous studies have shown a close relationship between stress and changes in immune system in animal models and in humans, some works suggesting an immunosuppression induced by stress, and others an increased immune function. In this study, we tested the effects of stress and the action of its main hormones in phagocytosis of apoptotic cells. We showed that hiperacute cold stress (-15°C for 10 min) did not change the phagocytic capacity and the interaction of apoptotic thymocytes by normal or LPS-activated peritoneal murine macrophages. Acute stress (4°C for 4 h) also did not change the percentage of phagocytosis and the interaction of apoptotic thymocytes by non activated macrophages; there was however a decrease in the phagocytic capacity of macrophages activated with LPS. This same effect was observed by *in vitro* experiment when corticosterone was incubated with activated macrophages in similar concentrations to those observed in plasma after cold stress. Other hormones, such as epinephrine and nor epinephrine had no effect *in vitro*, which shows that the inhibition of phagocytosis induced by acute cold stress could be at least in part attributed to corticosterone. Considering the possible physiological implications of these findings we should note that the decrease in phagocytosis of apoptotic cells could result in their changing into more advanced states of cell death, which may contribute to a prolonged state of inflammation and an increased risk of autoimmunity. The different behavior of normal and activated macrophages with this regard is discussed in relation to the possible effect of tolerization or priming of T lymphocytes in the development of autoimmune reactions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

- Figura 1.1** - Caminhos de comunicação entre o sistema nervoso central e o sistema imune. (KOHM; SANDERS,2000).....3
- Figura 1.2** - Processo psicológico e biológico da modulação induzida pelo estresse da função imune (FRIEDMAN; LAWRENCE, 2002).....7
- Figura 1.3** - Efeitos sistêmicos dos hormônios do estresse na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (ELENKOV; CHROUSOS, 2002)..... 15
- Figura 1.4** - Os três passos da remoção de células apoptóticas: (LAUBER *et al.*, 2004).....21
- Figura 1.5** - Manutenção da tolerância ao próprio através da rápida ingestão de células apoptóticas por fagócitos (ROOS *et al.*, 2004).....23
- Figure 1.6** - A sinapse de engolfamento (LAUBER *et al.*, 2004).....29
- Figura 3.1** - Timócitos tratados com dexametasona por 3 horas.....41
- Figura 3.2** - Macrófagos com timócitos apoptóticos fagocitados em meio RPMI com 2% de FBS (A) e macrófagos com timócitos apoptóticos aderidos em meio com 0,4%BSA (B).....43
- Figura 4.1** - Capacidade fagocítica de **macrófagos residentes** da cavidade peritoneal de camundongos após o **estresse hiperagudo (-15°C por 10 minutos)**.....50
- Figura 4.2** - Capacidade fagocítica de **macrófagos peritoneais ativados com LPS** (in vivo) após o **estresse hiperagudo (-15°C por 10 minutos)**.....51

Figura 4.3 - Capacidade fagocítica de macrófagos residentes da cavidade peritoneal de camundongos após o estresse agudo (4°C por 4 horas)	52
Figura 4.4 - Capacidade fagocítica de macrófagos peritoniais ativados com LPS (in vivo) após o estresse agudo (4°C por 4 horas)	53
Figura 4.5 - Efeito do estresse sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona.....	55
Figura 4.6 - Efeito do estresse sobre as concentrações plasmáticas de epinefrina (A) e norepinefrina (B).....	56
Figura 4.7 - Capacidade fagocítica de macrófagos residentes da cavidade peritoneal após a cultura com os hormônios (corticosterona e catecolaminas) por 4 horas.....	58
Figura 4.8 - Capacidade fagocítica de macrófagos peritoniais ativados com LPS (in vitro por 5 horas) após a cultura com os hormônios (corticosterona e catecolaminas) por 4 horas.....	59
Figura 4.9 - Capacidade fagocítica de macrófagos peritoniais ativados com LPS (in vivo) após a cultura com os hormônios (corticosterona e catecolaminas) por 4 horas.....	60
Figura 4.10 - Capacidade fagocítica de macrófagos peritoniais ativados com LPS (in vitro por 24 horas) após a cultura com corticosterona por 4 horas.....	62
Figura 4.11 - Morfologia vista por microscópio óptico dos macrófagos ativados com LPS <i>in vitro</i> por 5 horas (A), <i>in vivo</i> (B) e <i>in vitro</i> por 24 horas (C).....	63
Figura 4.12 - Efeito da corticosterona , epinefrina e norepinefrina na apoptose dos timócitos após 4 horas de cultura.....	64

Figura 4.13 - Capacidade fagocítica de **macrófagos peritoneais ativados com LPS (in vivo)** após a cultura com o antagonista do receptor de glicocorticóide, RU486, em conjunto com a corticosterona.....67

Figura 4.14 - Porcentagem de fagocitose de timócitos apoptóticos por **macrófagos ativados com LPS in vivo** após a cultura com competidores68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

- ABC1:** ATP-binding cassette 1
- ACTH:** adrenocorticotropic hormone
- ANOVA:** ANalysis Of VAriance
- AP-1:** activator protein 1
- APC:** antigen presenting cell
- AR:** adrenergic receptor
- cAMP:** cyclic adenosine monophosphate
- BCG:** Bacilo de Calmette-Guérin
- bFGF:** basic fibroblast growth factor
- BSA:** bovine serum albumine
- CBG:** corticosterone binding globulin
- CD:** cluster differentiation
- CNS:** central nervous system
- COX-2:** cyclooxygenase
- CR:** complement receptor
- CRH:** corticotropin-releasing hormone
- CRP:** proteína reativa C
- DNA:** deoxyribose nucleic acid
- ELAM:** endothelial leukocyte adhesion molecule
- ELMO:** engulfment and cell motility protein
- FBS:** fetal bovine serum
- FcγR:** receptores para a porção Fc da IgG ligada a partícula
- FITC:** fluorescein isothiocyanate
- FSH:** follicle-stimulating hormone
- Gas6:** growth arrest-specific gene 6
- GH:** growth hormone
- GM-CSF:** granulocyte / macrophage colony-stimulating factor
- cGMP:** cyclic guanosine monophosphate
- GR:** glucocorticoid receptor
- GREs:** glucocorticoid response elements

HLA: human leukocyte antigen
HMGB: high mobility group box chromosomal protein
HPA: hipotálamo-pituitária-adrenal
HPLC: high-performance liquid chromatograph
ICAM: intercellular adhesion molecule
IFN: interferon
Ig: imunoglobulina
IL: interleucina
LH: luteinizing hormone
LPB: lipopolysaccharide-binding protein
LPC: lisophosphatidilcoline
LPS: lipopolissacarídeo
MBL: manan-binding lectin
MCP: macrophage chemoattractant protein
MFG-E8: milk-fat globule epidermal growth factor 8
MIP: Macrophage Inflammatory Protein
MR: mineralocorticoid receptor
MSH: melanocyte-stimulating hormone
NE: norepinefrina
NK: células natural killer
NF κ B: nuclear factor kappa B
NOS: nitric oxide synthase
6-OHDA: 6-hidroxidopamina
p130Cas: Crk-associated tyrosine kinase substrate
PAF: platelet-activating factor
PBS: phosphate - buffered saline
PG: prostaglandina
PI-3 quinase: fosfoinositídeo 3 quinase
PKA: proteína-quinase A
PKC: proteína-quinase C
PLA₂: phospholipase A₂
POMC: proopiomelanocortina

PRL: prolactina

PS: phosphatidilserine

Pyk2: Proline-rich tyrosine kinase 2

PTX3: pentraxina-3

RANTES : Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted

RU486: mifepristona

SAP: soro amilóide P

SIV: simian immunodeficiency virus

SNC: sistema nervoso central

SNS: sistema nervoso simpático

SP: surfactant protein

Stat: signal transducer and activator of transcription

TGF: transforming growth factor

TH: thyroid hormone

Th: linfócito T helper

TNF: tumor necrosis factor

VCAM: vascular cell adhesion molecule

VEGF: vascular endothelial growth factor

VIP: vasoactive intestinal peptide

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. NEUROIMUNOMODULAÇÃO.....	2
1.1.1-) Estresse.....	2
1.1.2-) Ativação do eixo HPA e ação dos glicocorticóides.....	8
1.1.3-) Ativação simpática e ação das catecolaminas.....	13
1.1.4-) Efeitos do estresse sobre a fagocitose.....	17
1.2. FAGOCITOSE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS.....	19
1.2.1-) Aspectos gerais.....	19
1.2.2-) Reconhecimento e ingestão das células apoptóticas.....	24
1.2.3-) Mecanismos regulatórios da fagocitose de células apoptóticas.....	32
2. OBJETIVOS.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1-) Animais.....	39
3.2-) Exposição dos animais a condições de estresse.....	39
3.3-) Isolamento dos timócitos e indução de apoptose.....	39
3.4-) Isolamento e ativação de macrófagos peritoneais.....	41
3.5-) Ensaio de fagocitose e de interação.....	42
3.6-) Dosagem dos hormônios após o estresse.....	43
3.7-) Efeito da corticosterona e das catecolaminas sobre a fagocitose.....	45
3.8-) Fagocitose mediada pelo receptor para complemento.....	45
3.9-) Efeitos dos hormônios sobre a apoptose dos timócitos.....	46
3.10-) Bloqueio do receptor de glicocorticóide.....	46
3.11-) Utilização de competidores da fagocitose de células apoptóticas.....	47
3.12-) Análise estatística.....	47
4. RESULTADOS.....	48
4.1-) Efeito do estresse sobre a fagocitose e interação.....	49
4.2-) Efeito do estresse sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona e catecolaminas.....	54
4.3-) Efeito da corticosterona e das catecolaminas na fagocitose e interação.....	57
4.4-) Efeitos dos hormônios sobre a apoptose dos timócitos.....	61
4.5-) Efeito do antagonista do receptor de glicocorticóides.....	65
4.6-) Efeito da corticosterona na alteração da ação de receptores envolvidos com a fagocitose de células apoptóticas.....	65
5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÕES.....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. NEUROIMUNOMODULAÇÃO

1.1.1. ESTRESSE

Estudos conduzidos no campo da neuroimunologia mostram que a susceptibilidade a e a recuperação de infecções, reações alérgicas, inoculação de célula tumoral, e desordens autoimunes são fortemente influenciadas pela atividade do sistema nervoso e/ou endócrino (revisado por ADER, 2000).

De fato, existe uma regulação recíproca entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imune através da qual o SNC se comunica com o sistema imune via neuropeptídeos, neurotransmissores e hormônios enquanto o sistema imunológico, através de citocinas, óxido nítrico e prostaglandinas, informa o cérebro que um patógeno invadiu o corpo (Figura 1) (WEBSTER *et al.*, 2002).

Desta forma, não é de se surpreender que receptores para produtos do sistema imune (citocinas) e para produtos do sistema endócrino (hormônios) estejam presentes na mesma célula. O exemplo mais clássico é a expressão de receptores de IL-1 especificamente em uma das principais células secretoras de hormônios na glândula pituitária, a célula somatotrófica (KELLEY, 2004).

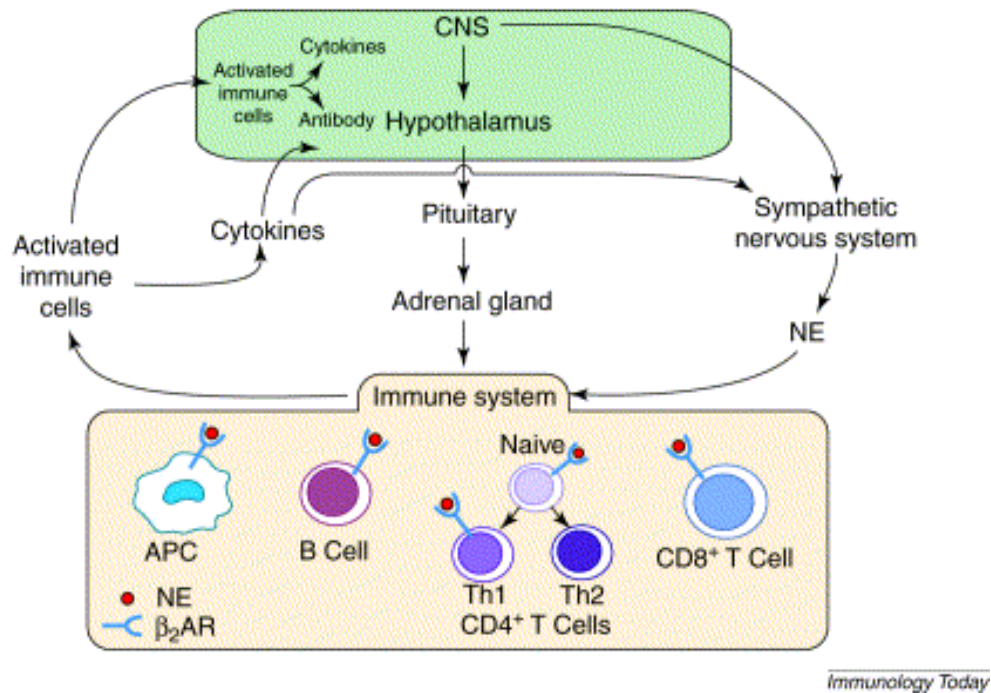


Figura 1.1. Caminhos de comunicação entre o sistema nervoso central e o sistema imune. CNS: central nervous system; NE: nor epinephrine; β_2 -AR: adrenergic receptor β_2 ; Th: linfócito T helper; APC: antigen presenting cell (KOHM; SANDERS, 2000).

O SNC tem a capacidade tanto de produzir como de modular reações inflamatórias, não apenas em resposta à infecção, trauma ou dano tecidual, mas também em resposta ao estresse (BLACK, 2002). O estresse pode ser definido como um estado de perturbação da homeostase provocado por estímulos psicológicos, ambientais ou fisiológicos (BLACK, 2002).

Evidências mostram uma íntima relação entre o estresse e a ocorrência de variações na função imune tanto em modelos animais quanto em humanos (ADER, 2000), sendo em alguns trabalhos sugerida uma imunossupressão induzida pelo estresse (como PALERMO-NETO *et al.*, 2003 e GARBULINSKI *et al.*, 1991), enquanto em outros foi revelado um aumento da função imune (como DHABHAR, 2002 e SUNDARESAN *et al.* 1990).

Em experimentos com ratos e cobaias, nos quais a desgranulação de mastócitos ocorre por exposição de ratos a um alérgeno acoplado a um estímulo sensorial, torna-se evidente o controle cerebral sobre esta resposta imune, já que a desgranulação também ocorre sob o estímulo sensorial sozinho (BLACK, 2002). Além disso, alguns estudos indicam que vários estressores psicológicos sozinhos podem induzir a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α (revisado por DHABBAR, 2002).

Um experimento clássico feito por Previtte e Berry (1962) mostra claramente a interação do ambiente com infecções, no qual quando camundongos eram colocados em condições ambientais confortáveis (25°C), a inoculação de *Staphylococcus aureus* virulenta causava 70% de morte, mas a *S. aureus* avirulenta causou uma taxa de morte de apenas 20% nos camundongos. Resultados totalmente diferentes foram obtidos quando os camundongos foram mantidos em uma temperatura subótima (5°C). A bactéria virulenta continuou a causar 70% de mortalidade, mas a bactéria avirulenta matou 91% dos camundongos. Resultados idênticos também foram obtidos com *Salmonella typhimurium* virulenta e avirulenta.

Desta forma, estresse físico, assim como estressores químicos e psicológicos, podem exercer um efeito na reatividade imune e, conseqüentemente na doença, embora seja importante fazer uma distinção entre estresse transitório (como uma infecção) e estresse que existe por um longo período (como no caso de fatores associados com baixas condições sócio-econômicas, por exemplo). Ao contrário da concepção popular de que o estresse regularia negativamente o sistema imune, alguns estudos têm sugerido que o estresse agudo deve facilitar alguns aspectos da função imune. Por exemplo, ratos sujeitos ao estresse por imobilização exibiram uma resposta de hipersensibilidade tardia mais acentuada do que os animais controles (DHABHAR, 2002). Humanos expostos a um estresse (discurso televisionado) exibiram um aumento transitório do número e função das células natural killer

– NK (LARSON *et al.*, 2001). Um estresse mais intenso ou de longa duração, por outro lado, impediria as mesmas funções imunes: ratos expostos por várias semanas de imobilização diária, por exemplo, mostraram um grande declínio na resposta de hipersensibilidade tardia. Humanos com histórias de vida com estresse prolongado exibiram atividade da NK reduzida durante e após o estresse do discurso.

Sabe-se que o SNC regula o sistema imune através de dois mecanismos principais: (1) pela ativação do eixo HPA (hipotálamo- pituitária- adrenal), o qual culmina na liberação de glicocorticóides; e (2) através do sistema nervoso simpático (SNS), com a liberação de norepinefrina e epinefrina (WEBSTER *et al.*, 2002).

Sob uma condição de estresse, as células do núcleo paraventricular do hipotálamo são ativadas e secretam CRH (corticotropin releasing hormone), o coordenador da resposta ao estresse. O CRH entra no sistema porta hipofisário, atingindo as células corticotróficas da pituitária anterior, as quais produzem POMC (proopiomelanocortina), um polipeptídeo que é subsequentemente clivado, formando ACTH (adrenocorticotropic hormone), β - endorfina e α -MSH (α melanocyte stimulating hormone). O ACTH chega até o córtex das glândulas adrenais através da corrente sanguínea, onde estimula, principalmente, a liberação de glicocorticóides (corticosterona em roedores e cortisol em humanos) (BLACK, 2002).

O CRH também estimula o locus coeruleus, uma densa coleção de células autonômicas no tronco cerebral a secretar norepinefrina nas terminações nervosas simpáticas. A ativação do SNS centralmente é transmitida para a medula da adrenal, onde as fibras simpáticas estimulam as células cromóafins a liberarem norepinefrina e principalmente epinefrina (BLACK, 2002). Juntos, glicocorticóides e as catecolaminas, epinefrina e norepinefrina, são os principais hormônios da resposta ao estresse. Entretanto, outros hormônios como o

glucagon e o hormônio do crescimento também são considerados hormônios do estresse (KELLEY, 2004).

Variáveis genéticas e psicológicas, entretanto, podem ser responsáveis pela vulnerabilidade individual ao estresse. O estresse do começo de um novo programa acadêmico, por exemplo, impede a atividade das NKs particularmente em estudantes menos otimistas (GLASER, 2004). Macacos infectados com SIV menos sociáveis mostraram maior progressão da doença do que os animais mais sociáveis (CAPITANIO *et al.*, 1999). Em suma, vulnerabilidade psicológica ao estresse aumenta o impacto imunológico do estressor (Figura 2).

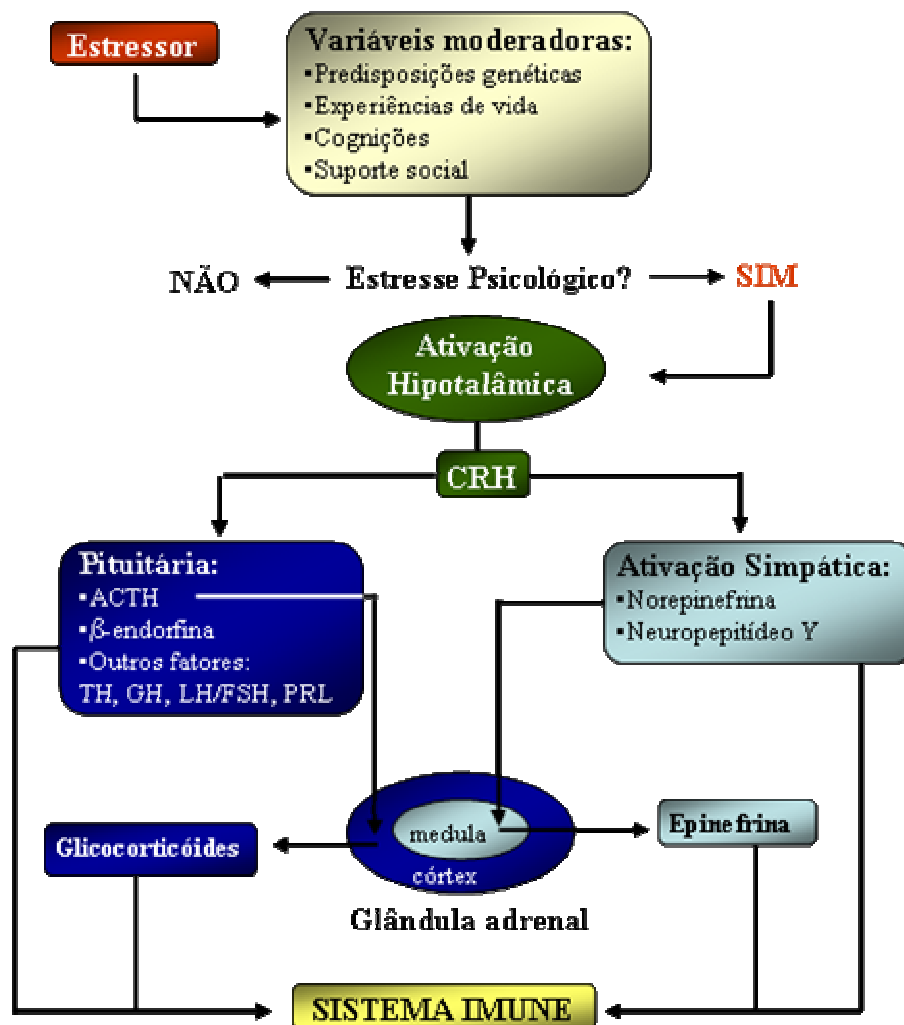


Figura 1.2. Processo psicológico e biológico da modulação induzida pelo estresse da função imune. Estas interações entre os sistemas nervoso e imune representam parte das interações conhecidas. Hormônios como substância P, peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, por exemplo, têm profundos efeitos na função imune. Em adição, células imunocompetentes podem sintetizar muitos hormônios da pituitária e do sistema nervoso central. ACTH, adrenocorticotropin hormone; CRH, corticotropin releasing hormone; FSH, follicle-stimulating hormone; GH: growth hormone; LH, luteinizing hormone; PRL, prolactin; and TH, thyroid hormone (FRIEDMAN; LAWRENCE, 2002).

Os tecidos linfóides são inervados tanto pelo sistema nervoso simpático, o qual libera norepinefrina, como pelo sistema nervoso parassimpático, que libera acetilcolina. Receptores para estes e outros neurotransmissores estão presentes nos leucócitos. Os outros neurotransmissores incluem VIP (vasoactive intestinal peptide), substância P, histamina e

serotonina. Da mesma forma, receptores para os mediadores neuroendócrinos, incluindo CRH, α -MSH e leptina também são encontrados nos tecidos linfóides (STEINMAN, 2004).

A acetilcolina potencialmente modula várias reações imunes clássicas via nervo vago, podendo suprimir a resposta de choque sistêmico após a injeção de endotoxina. A ativação do receptor nicotínico da acetilcolina, expresso em macrófagos, inibe a secreção de IL-1 e TNF (STEINMAN, 2004). Assim, um neurotransmissor comum, como a acetilcolina, pode modular reações imunes letais tal como o choque séptico.

As conexões entre o sistema neuroendócrino e o sistema imune promovem um sistema de regulação fina requerido para a saúde. Distúrbios em qualquer nível do eixo HPA ou na inervação simpática, bem como na ação dos glicocorticóides e das catecolaminas conduzem a um desequilíbrio neste sistema e aumentam a susceptibilidade à infecção e doenças inflamatórias ou autoimunes (WEBSTER *et al.*, 2002).

Uma compreensão detalhada, portanto, do mecanismo pelo qual o sistema neuroendócrino regula o sistema imune nos níveis sistêmico, anatômico, celular e molecular irá informar não apenas a patogênese e tratamento de condições autoimunes/inflamatórias e doenças infecciosas, mas também condições que predis põe à susceptibilidade ou resistência a estas doenças .

1.1.2. ATIVAÇÃO DO EIXO HPA E AÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES

Glicocorticóides circulam no plasma associados à albumina ou ao CBG (corticosterone-binding globulin) e apenas os corticóides livres conseguem penetrar pela membrana plasmática e se ligar ao seu receptor no citoplasma da célula alvo. Os receptores de glicocorticóides se localizam inativados no citoplasma como complexos multiprotéico e após

se ligarem ao ligante, eles se dissociam destes complexos e translocam para o núcleo, onde se ligam como homodímeros aos elementos alvos ou aos GREs (glucocorticoid response elements) no DNA (WEBSTER *et al.*, 2002).

Há dois receptores para glicocorticóides: o receptor de glicocorticóide (GR) e o receptor de mineralocorticóide (MR). Os dois são colocalizados em algumas áreas do cérebro e nos leucócitos. A corticosterona (e o cortisol) tem maior afinidade pelo MR do que pelo GR. Desta forma, em baixos níveis, a corticosterona se liga ao MR, e apenas em altos níveis, como durante o estresse, o GR é ocupado (FUNDER, 1997).

O GR tem sido envolvido tanto na estimulação como na supressão de genes. Ele também pode modular a expressão de genes via interação com outros fatores de transcrição, tais como AP-1 e NF- κ B, o qual é o maior fator envolvido na regulação de citocinas e outras respostas imunes. Desta forma, glicocorticóides podem modular a expressão de citocinas, expressão de moléculas de adesão e tráfego de células imunes, maturação e diferenciação destas células, expressão de quimiocinas e migração celular, e produção de mediadores inflamatórios (WEBSTER *et al.*, 2002).

Glicocorticóides, no geral, suprimem maturação, diferenciação e proliferação de células imunes envolvidas em todos os aspectos da imunidade, incluindo imunidade inata, função de célula B e T e reações alérgicas crônicas (revisado por WEBSTER *et al.*, 2002). No entanto, isto é dependente da dose e da natureza do glicocorticóide em questão.

Alguns trabalhos mostram que o tráfego de leucócitos é reduzido por glicocorticóides através da supressão da produção de quimiocinas, como IL-5, RANTES, MCP-1, 2 e 3, e eotaxina, além da supressão de moléculas de adesão, tais como ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, E-selectina e L-selectina (WEBSTER *et al.*, 2002).

Alguns estudos também mostram que a hipercortisolemia induzida pelo estresse causa uma redistribuição dos leucócitos com a redução no número de linfócitos e monócitos circulantes em camundongos (DHABBAR, 2002). Estas mudanças foram significativamente reduzidas em animais adrenalectomizados, e foram reproduzidas em outros animais pela administração de corticosterona. No entanto, estas monocitopenia e linfocitopenia vistas com o estresse também estão presentes com o ritmo circadiano dos glicocorticóides no começo da manhã em humanos. Desta forma, torna-se evidente que isto é devido à redistribuição ao invés da destruição destas células, como discutido por McEwen e colaboradores (1997). Os leucócitos, assim sinalizados, parecem sair da circulação e entrar em outros compartimentos promovendo sua sobrevivência e sua função efetora (DHABBAR, 2002).

Corticóides afetam a produção de mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandinas e óxido nítrico. O primeiro é modulado através da repressão dos níveis de mRNA de PLA₂ (phospholipase A₂) citosólica e de COX-2 (cyclooxygenase), enquanto o segundo é modulado através do impedimento da indução de NOS II (nitric oxide synthase II) e da inibição da transcrição de iNOS (a forma induzível desta enzima) (WEBSTER *et al.*, 2002).

Os glicocorticóides também suprimem a produção de IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ e GM-CSF, enquanto estimulam a produção das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, causando portanto, uma troca do padrão de imunidade Th1 (o qual é caracterizado pela secreção de citocinas, tais como IFN- γ , IL-2 e TNF- α , pelos linfócitos T helper, o que leva a uma resposta imune celular) para Th2 (o qual é caracterizado pela secreção de principalmente IL-4, IL-10 e IL-13 pelos linfócitos T helper, que promovem um resposta imune humoral) (ELENKOV, 2004). Os glicocorticóides prejudicam a expressão de IL-12 ou seu receptor, e acredita-se que esta regulação seja o principal mecanismo pelo qual eles medeiam esta troca de Th1 para Th2. Esta supressão de IL-12 ocorre pela inibição da

fosforilação do fator de transcrição Stat4 na cascata de sinalização da IL-12, e esta inibição é mediada por GR. Isto é específico para a imunidade mediada por Th1 porque a fosforilação do fator de transcrição Stat6, o qual está envolvido na cascata de sinalização da IL-4, não é afetada por glicocorticóides (WEBSTER *et al.*, 2002).

Alterações no padrão de imunidade Th1/Th2 são características de algumas doenças autoimunes. Artrite reumatóide, esclerose múltipla e diabetes melitus tipo I são exemplos de doenças autoimunes nas quais há uma mudança para imunidade mediada por Th1, com excesso de produção de IL-12 e TNF- α . Lupus eritematoso sistêmico possui imunidade mediada por Th2, com excesso de IL-10. Em situações nas quais há um excesso da produção de glicocorticóides, como em modelos animais com o eixo HPA hiperativo (ratos F344/N) ou em mulheres no terceiro trimestre de gravidez, há uma resistência relativa a doenças autoimunes associadas com Th1. Inversamente, animais com ausência de glicocorticóides ou um eixo HPA hipotativo (ratos LEW/N) são susceptíveis a estas doenças autoimunes de padrão Th1. A recuperação destes animais está correlacionada com a administração de glicocorticóides, enquanto a adrenalectomia resulta na progressão fatal da doença (WEBSTER *et al.*, 2002).

Ratos Lewis (LEW/N) são altamente susceptíveis ao desenvolvimento de uma ampla variedade de doenças autoimunes/inflamatórias em resposta a uma variedade de estímulos antigênicos ou proinflamatórios. Ratos Fischer (F344/N) altamente histocompatíveis, são relativamente resistentes a estas mesmas doenças após exposição a mesmas doses de antígenos. Estas duas linhagens também mostraram diferenças relacionadas à responsividade do eixo HPA, com os ratos F344/N (resistentes à inflamação) exibindo uma resposta do eixo HPA excessiva comparado com os ratos LEW/N (susceptíveis à inflamação). Diferenças na

expressão de CRH, POMC, CBG e expressão e ativação do receptor de glicocorticóide têm sido mostradas nestas duas linhagens de ratos (STERNBERG *et al.*, 1989).

Uma variedade de intervenções cirúrgicas e farmacológicas no eixo HPA nestas linhagens de ratos, bem como em linhagens de camundongos, alteram o curso e a gravidade da doença autoimune/inflamatória. Assim, nos ratos F344/N, o tratamento com o antagonista de glicocorticóides RU486 é associado com alta mortalidade e desenvolvimento de artrite em resposta à injeção de parede celular de streptococos (STERNBERG *et al.*, 1989). Aproximadamente 50% dos ratos morreram após a infecção com *Salmonella typhimurium*, mas ratos adrenalectomizados sofreram 100% de letalidade após a infecção com esta bactéria (EDWARDS *et al.*, 1991). Já em ratos LEW/N, tanto o tratamento com baixas doses de dexametasona como o transplante intracerebroventricular com tecido hipotalâmico de ratos F344/N atenuaram significativamente a artrite (STERNBERG *et al.*, 1989).

Assim, uma resposta falha do eixo HPA ao estímulo com CRH ou estresse psicológico tem sido mostrada em uma variedade de doenças autoimunes incluindo artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjogren, fibromialgia e síndrome da fadiga crônica, bem como em asma alérgica e dermatite atópica. Ao contrário, em humanos, estimulação crônica excessiva das respostas ao estresse, com níveis de glicocorticóides elevados cronicamente, está associado com o aumento da susceptibilidade à infecção viral e queda na produção de anticorpos após vacinação. Tal estresse é vivenciado por pessoas que cuidam de pacientes com doença de Alzheimer, estudantes em períodos pré-exames e pessoas sofrendo estresse ou exercício extremo (GLASER, 2004).

O estresse repetido, com repetida secreção de corticosteróides, também pode resultar em um dano hipocampal. Já que o hipocampo está envolvido na supressão da produção de corticosteróides por feedback, níveis elevados de corticosteróides irão persistir após estresse

especificamente em pessoas mais velhas, as quais já sofreram vários tipos de estresse ao longo da vida. Desta forma, a capacidade de se adaptar ao estresse declina ao longo dos anos. (SAPOLSKY, 1990). Black (2002) sugere que doença inflamatória crônica deve ser decorrente do acúmulo de reações inflamatórias/estresse crônico repetidos ao longo dos anos, mas Kelley (2004) mostrou que injeções de hormônio de crescimento conseguem reverter a perda de células associada com a idade em ambos órgãos linfóides primários, o timo e a medula óssea.

Se a resposta ao estresse e/ou a resposta inflamatória vai ocorrer, depende de muitos fatores. Por exemplo, corticosteróides aumentam eventos inflamatórios inicialmente; depois, o eixo HPA protege contra inflamação excessiva (WEBSTER *et al.*, 2002). Sem dúvida, uma maior compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos na secreção de glicocorticóides e a sua regulação do sistema imune sob condições normais e em doenças é fundamental para nossa compreensão da patogênese de doenças inflamatórias e para o desenvolvimento de terapias efetivas para tais doenças.

1.1.3. ATIVAÇÃO SIMPÁTICA E AÇÃO DAS CATECOLAMINAS

O sistema nervoso simpático (SNS) e seu neurotransmissor primário, norepinefrina, podem aumentar ou inibir a reatividade imune dependendo de alguns fatores como a magnitude e o tempo de ativação simpática, as subpopulações de leucócitos que participam da resposta e a idade e o *background* genético do hospedeiro (MADDEN, 2003).

A inervação de um órgão é requerida para o estabelecimento de certas reações inflamatórias experimentais. Por exemplo, artrite adjuvante, a qual é provocada pela injeção de adjuvante de Freund na pata, é mais grave nas juntas, as quais são mais ricamente

inervadas. Além disso, se a inervação é cortada, a artrite não pode ser induzida. Isto também corrobora com casos clínicos, nos quais a artrite reumatóide desaparece no sítio afetado por um acidente vascular cerebral (BLACK, 2002).

A epinefrina e a norepinefrina se ligam a receptores α - e β - adrenérgicos (AR), os quais são receptores acoplados à proteína G, com diferentes afinidades. Atualmente são descritos nove tipos de receptores adrenérgicos, mas os principais são: α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e β_3 . A estimulação dos β -ARs ativa a adenilato ciclase, aumentando os níveis de cAMP intracelular e ativação da proteína-quinase A (PKA), enquanto a estimulação de α_1 -ARs leva à ativação da fosfolipase C e seus efeitos são mediados principalmente pelo influxo de Ca^{2+} e pela ação da proteína-quinase C (PKC). Já a estimulação dos α_2 -ARs causa inibição da adenilato ciclase (HEIN; KOBILKA, 1995).

Os β_2 -ARs estão presentes na superfície de quase todas células imunes, com a notável exceção dos clones Th2 (MADDEN, 2003). Desta forma, o sistema nervoso simpático também pode alterar o balanço Th1/Th2 através da estimulação de β -AR nos macrófagos, os quais passam a liberar IL-10 e têm a liberação de IL-12 suprimida, e nas células Th1, as quais são inibidas (Figura 3). A liberação de IL-10 por macrófagos após uma injúria cerebral, por exemplo, pode ser bloqueada com propanolol, um antagonista β -adrenérgico. Em adição, a estimulação simpática aumenta a produção de citocinas Th2 (como IL-10), enquanto inibe a produção de citocinas Th1 (como IL-12) em culturas de sangue total estimulado com LPS. E agonistas do β_2 -AR inibem o desenvolvimento de células do tipo Th1, enquanto promove a diferenciação de Th2 (STEINMAN, 2004).

Desta forma, uma secreção aumentada sistemicamente de ambos glicocorticóides e catecolaminas, através da inibição e estimulação da secreção de citocinas do tipo Th1 e Th2, respectivamente, causam uma supressão seletiva da imunidade celular, mudando para um

padrão humoral de imunidade. Isto é corroborado por estudos que mostram que hormônios do estresse inibem a função efetora de componentes da imunidade celular, tais como a atividade de NK, célula T e macrófagos ativados (ELENKOV; CHROUSOS, 2002).

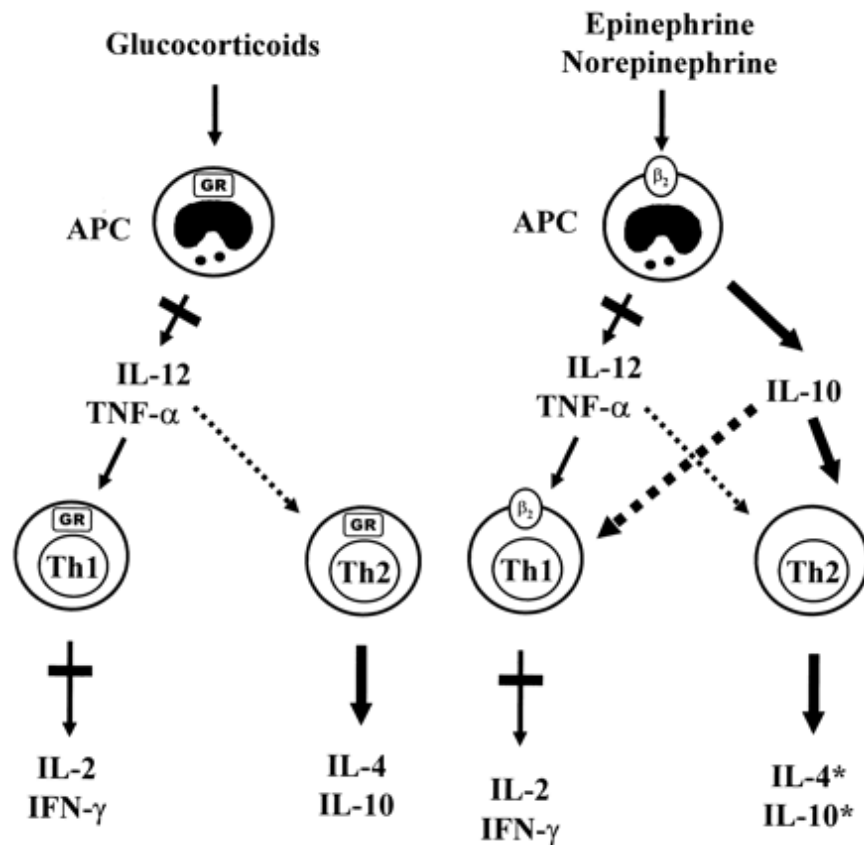


Figura 1.3. Efeitos sistêmicos dos hormônios do estresse na produção de citocinas proinflamatórias e anti-inflamatórias. Note que glicocorticóides não afetam a produção de IL-10 por monócitos/macrófagos, mas aumentam a produção de IL-10 e IL-4 pelas células Th2. As catecolaminas aumentam a produção de IL-10 por monócitos/macrófagos, entretanto, eles não afetam as células Th2 diretamente, já que estas células têm pouco ou nenhum receptor β -adrenérgico. * Indiretamente, entretanto, as catecolaminas devem potencializar a produção de citocinas pelas células Th2, já que elas removem a inibição destas células exercida pela IL-12. Linhas sólidas representam estimulação; linhas tracejadas representam inibição. APC: antigen-presenting cell; β : β -adrenérgico receptor; GR: glucocorticoid receptor; IL: interleukin; IFN: interferon; Th: linfócito T helper; TNF: tumor necrosis factor (ELENKOV; CHROUSOS, 2002).

Ao contrário da expressão mais amplamente distribuída dos β -AR, os α -AR não são facilmente detectados sob condições normais. α_2 -AR tem sido demonstrado na superfície de macrófagos estimulados e, ao contrário dos β -AR, medeia o aumento da produção de TNF- α provocado pelo LPS. Já que a resposta à estimulação com agonista β -adrenérgico declina durante a maturação de monócitos humanos em macrófagos, é possível que em certos compartimentos do corpo, o efeito das catecolaminas mediado por α -AR torne-se transitoriamente dominante (ELENKOV; CHROUSOS, 2002).

Mudanças na expressão de AR nos leucócitos têm sido encontradas em várias doenças autoimunes humanas. α_1 -AR foi demonstrado nos linfócitos de sangue periférico de crianças com uma forma severa de artrite reumatóide juvenil. A densidade de β -AR e capacidade de sinalização são alteradas nos linfócitos de sangue periférico de adultos com artrite reumatóide e esclerose múltipla. Tais alterações devem refletir mudanças na atividade simpática e disponibilidade das catecolaminas, mas também é possível que o processo da doença por ele mesmo provoque mudanças na expressão dos ARs nos linfócitos que compensam ou exacerbam a progressão da doença (MADDEN, 2003). Estes dados precisam ser experimentalmente testados antes que a manipulação da sinalização dos ARs possa ser utilizada terapêuticamente.

Células do sistema imune também são expostas a catecolaminas de fonte intracelular. Recentemente, epinefrina, norepinefrina e seus metabólitos têm sido detectados nos linfócitos e macrófagos e podem ser liberados por estímulo ativador (MADDEN, 2003). Estas células devem sintetizar catecolaminas ou elas captam e estocam de fontes extracelulares.

A função do sistema nervoso simpático e a sinalização do AR na regulação imune têm sido estudadas *in vivo* por uma variedade de experimentos. O abalo do nervo noradrenérgico com a neurotoxina 6-OHDA (simpatectomia química) ou o tratamento com o antagonista não

seletivo de β -ARs nadolol antes da imunização reduziu a resposta de anticorpo dirigida por Th2 e diminuiu a reação de hipersensibilidade do tipo tardia ao contato com o agente sensibilizador, sugerindo que o SNS pode aumentar a reatividade imune (MADDEN, 2003). A administração de epinefrina antes da sensibilização antigênica aumentou a resposta de hipersensibilidade tardia e aumentou a celularidade dos linfonodos drenantes (DHABBAR, 2002).

Em outros estudos, entretanto, a exposição a estressores ou a agentes que ativam o SNS reduziu as respostas de células T, reatividade imune anti-viral e atividade das células NK. Esta imunossupressão foi prevenida pelo tratamento com β -bloqueadores. A denervação noradrenérgica antes da imunização intraperitoneal também aumentou os níveis de anticorpos no soro em ratos e em camundongos C57BL/6, mas não em camundongos BALB/c (revisado por MADDEN, 2003).

A discordância entre estes resultados demonstra que o *background* genético (isto é, linhagem animal), o sítio de imunização e as células Th envolvidas podem influenciar na resposta final a um determinado estressor (MADDEN, 2003). O tipo de célula imune envolvida e o seu estado de maturação/ativação também contribuem para a complexidade das interações das catecolaminas com o sistema imune.

1.1.4. EFEITOS DO ESTRESSE SOBRE A FAGOCITOSE

Estudos sobre os efeitos do estresse sobre a fagocitose têm sido bastante contraditórios, com alguns trabalhos mostrando diminuição da capacidade fagocítica (PALERMO-NETO *et al*, 2003; CHEN *et al*, 2002; GARBULINSKI *et al*, 1991; BACCAN, 2004), enquanto outros revelam um aumento na fagocitose induzida pelo estresse

(FERRANDEZ e DE LA FUENTE, 1999; BARRIGA *et al*, 2001; SHILOV e ORLOVA, 2003; SUNDARESAN, *et al*, 1990; KIZKAI *et al*, 2001). Isto pode ser explicado pelas diferenças entre estes trabalhos no tipo e duração do estresse, no estado de ativação e na natureza da célula fagocítica e principalmente nos receptores envolvidos, já que os diferentes trabalhos utilizam diferentes tipos de partículas.

Um estudo feito em nosso laboratório por Baccan (2004) sobre a capacidade fagocítica de macrófagos em condições de estresse pelo frio demonstrou as diferenças nos efeitos do estresse e nas ações da corticosterona e das catecolaminas sobre a fagocitose mediada por diferentes receptores e por diferentes estados de ativação do fagócito: a fagocitose de imunocomplexos foi diminuída pelo estresse de apenas 10 minutos de duração, enquanto o mesmo não ocorreu com a fagocitose de imunocomplexos opsonizados com complemento, nem com a fagocitose de zimosam. Também foi mostrado que este efeito ocorre apenas em macrófagos não ativados e aponta para possíveis efeitos não genômicos da corticosterona na inibição na fagocitose.

Nenhum estudo, porém, tem relacionado o estresse ou a ação de seus hormônios com a fagocitose de células apoptóticas, um evento importante na resolução da inflamação e na homeostase celular, sendo sua investigação de grande interesse, já que, assim como alterações no eixo HPA, alterações na fagocitose de células apoptóticas também levam ao desenvolvimento de doenças autoimunes.

1.2. FAGOCITOSE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS

1.2.1. ASPECTOS GERAIS

A regulação da homeostase em organismos multicelulares envolve a geração de novas células por proliferação celular bem como a remoção de células danificadas ou indesejadas por apoptose, a qual caracteriza-se por mudanças iniciais da membrana celular, condensação e fragmentação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (MESSMER; PFEILSCHIFTER, 2000). Este tipo de morte celular programada tem uma função central em muitos processos biológicos fundamentais, incluindo “*turnover*” tecidual normal, remodelamento de tecidos embriológicos, desenvolvimento do sistema imune e no processo de resolução da inflamação (MADERNA; GODSON, 2003).

A apoptose de células residentes e de células imunes em um sítio inflamatório, é muitas vezes, engatilhada por macrófagos ativados, os quais também destroem a matriz extracelular através da produção de metaloproteinases, tanto direta como indiretamente. Os macrófagos têm um arsenal de citocinas e radicais livres que têm sido descritos como sendo pró-apoptóticos para diferentes células. Entretanto, os macrófagos limitam a inflamação e a injúria tecidual pela rápida remoção destas células que estão morrendo (DUFFIELD, 2003).

Examinando a ingestão de células senescentes por macrófagos através de microscopia eletrônica, pode-se sugerir que esta internalização seja similar ao mecanismo de “zíper” observado na fagocitose mediada por receptores Fc, no qual interações repetidas entre os ligantes na célula alvo e seus receptores na célula fagocítica são requeridas até a completa internalização da partícula ser atingida (GILES *et al*, 2000). Este mecanismo é diferente

daquele ocorrido durante a fagocitose mediada por complemento, no qual o alvo submerge no fagócito com um mínimo distúrbio da membrana. Em suporte a isso, a estabilização de microtúbulos via elevação de cGMP (cyclic guanosine monophosphate) não afetou a fagocitose de neutrófilos apoptóticos, enquanto que a quebra dos microfilamentos após elevação de cAMP (cyclic adenosine monophosphate) preveniu a ingestão (ROSSI *et al.*, 1998).

Quando os macrófagos ingerem partículas opsonizadas, agentes estranhos ou células necróticas, eles engatilham uma resposta pró-inflamatória; no entanto, a ingestão de células apoptóticas pelos macrófagos não promove a sua ativação, o que deve ser importante para a remoção "silenciosa" destas células no processo fisiológico normal (FADOK *et al.*, 1998). De fato, muitos estudos *in vitro* têm demonstrado que quando macrófagos fagocitam células apoptóticas, sejam elas neutrófilos, linfócitos ou células do estroma, eles não produzem nem liberam mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , MCP-1 e MIP-1 α . Porém, estes macrófagos não são inertes, eles produzem mediadores anti-inflamatórios, tais como TGF- β , PAF (platelet-activating factor) e PGE₂, os quais suprimem uma resposta inflamatória através de mecanismos autócrinos e parácrinos (Figura 4) (FADOK *et al.*, 1998). Alguns estudos, como o de Byrne e Reen (2002), também mostram a liberação de IL-10 por estes macrófagos. Além disso, os macrófagos passam a expressar transglutaminase tecidual, a qual promove reações cruzadas de proteínas da matriz, tais como fibronectina, colágeno, fibrinogênio, laminina e osteopontina, produzindo uma estrutura polimérica resistente à hidrólise por proteases. Há também dados que sugerem que os macrófagos que fagocitam células apoptóticas são importantes na angiogênese, já que eles geram um grande número de citocinas angiogênicas, incluindo VEGF, bFGF, TGF- α e TNF- α (DUFFIELD, 2003).

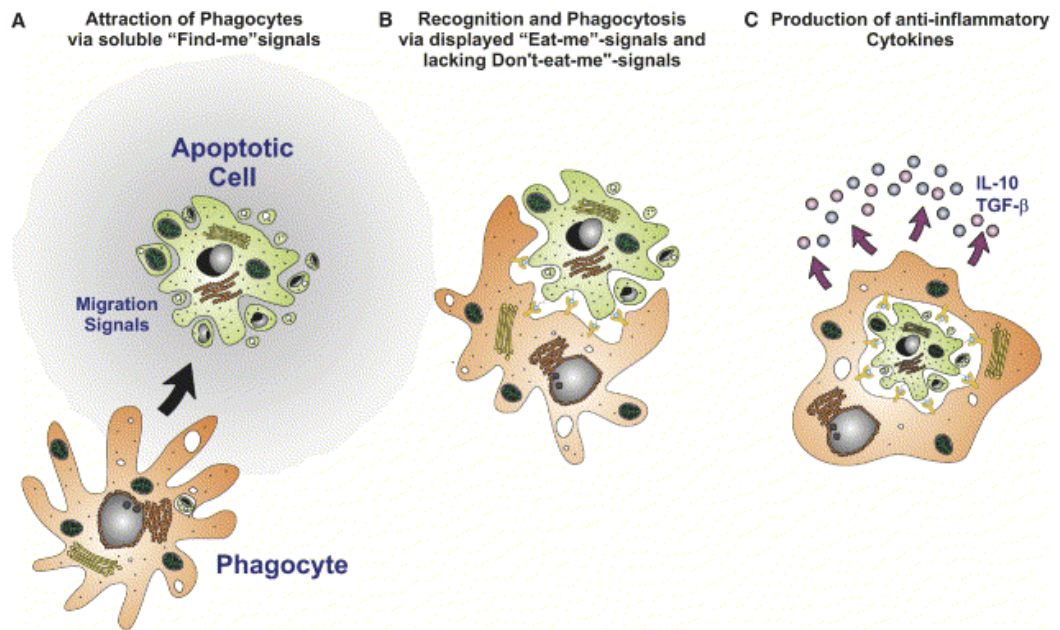


Figura 1.4. Os três passos da remoção de células apoptóticas: (A) As células que estão morrendo liberam sinais solúveis de “find-me”, os quais atraem fagócitos profissionais. (B) Uma vez no sítio de ação, em íntimo contato com a célula apoptótica, o fagócito reconhece sua presa pela presença de sinais de “eat-me” e ausência de sinais de “don’t eat-me” na superfície da célula apoptótica, conduzindo assim, a internalização desta. (C) Tendo ingerido as células apoptóticas, o fagócito começa a produzir citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , criando assim um ambiente anti-inflamatório ao redor do sítio de morte da célula apoptótica (LAUBER *et al.*, 2004).

Segundo Filaci e colaboradores (2003), a fagocitose de células apoptóticas também inibe a apresentação de antígenos exógenos pelos macrófagos às células T. Tal inibição é mediada pela ativação dos mecanismos que induzem o comportamento funcional anti-inflamatório dos macrófagos, mas também pela ligação do DNA apoptótico à molécula HLA de classe II deste fagócito. Este fenômeno colabora para a queda da expressão de HLA II na membrana do macrófago, o qual também inibe a apresentação de antígenos pelas células dendríticas vizinhas através da secreção de TGF- β .

Desta forma, a fagocitose de células apoptóticas pelo macrófago promove sua mudança de uma célula inflamatória degradadora de matriz e promotora de morte celular para uma célula anti-inflamatória que secreta e estabiliza novos componentes da matriz, prolifera

células e recupera o tecido. Este efeito após a fagocitose de células apoptóticas tem longa duração, já que mesmo após 48h da ingestão, os macrófagos foram incapazes de responder a um estímulo inflamatório (DUFFIELD, 2003).

Um estudo feito por Voll e colaboradores (1997) sobre a ligação entre monócitos humanos e linfócitos apoptóticos, mostrou similaridade no comportamento do monócito com o do macrófago, já que a ligação de células apoptóticas inibiu sua ativação induzida por LPS e também promoveu a produção de citocinas anti-inflamatórias. Como os monócitos têm pouca capacidade para fagocitose de partículas ou células, somente a ligação com as células apoptóticas deve ser suficiente para sinalizar mudanças no fenótipo destas células.

Ao sofrerem apoptose, os leucócitos perdem sua habilidade de responder a sinais recebidos e de liberar conteúdos tóxicos, os quais são lacrados por uma ligação cruzada na membrana de proteínas intracelulares. Desta forma, uma célula apoptótica não oferece nenhum perigo para o tecido ao redor, ao contrário de uma célula necrótica, a qual tem sua membrana rompida e seu conteúdo interior extravasado (MAGNUS *et al*, 2002). Os efeitos pró-inflamatórios das células necróticas têm sido ligados à liberação de proteínas de choque térmico, proteína cromossomal HMGB1 (high mobility group box chromosomal protein 1) e altas concentrações de ácido úrico (ROOS *et al*, 2004), os quais não ocorrem em células morrendo por apoptose, mesmo nos estágios mais tardios.

No entanto, se as células apoptóticas não forem fagocitadas rapidamente, elas poderão sofrer necrose secundária, liberando quantidades significativas de enzimas tóxicas, as quais são prejudiciais para o tecido circundante, e se a necrose secundária for abundante, o pH intersticial pode cair e enzimas lisossomais podem ser ativadas. Ao mesmo tempo, inibidores de proteinases podem ser inativados pela oxidação nos tecidos que contêm células mortas (HENSON; JOHNSTON, 1987). Além disso, a falha na remoção de células apoptóticas pode

potencializar a apresentação de peptídeos autoantigênicos. O processo de apoptose no qual caspases degradam proteínas, permite a formação potencial de neoantígenos capazes de induzir uma resposta autoimune em indivíduos susceptíveis, possivelmente devido a uma deficiência fagocítica por macrófagos residentes. E a ingestão destes autoantígenos pelas células dendríticas deve conduzir a uma apresentação profissional para os linfócitos T naives e, portanto, à perda da tolerância (Figura 5) (HERMANN *et al*, 1998). A persistência de destroços apoptóticos, na forma de nucleossomos e spliceossomos ocorre no surgimento do lupus eritematoso sistêmico (TAX *et al*, 1995). Entretanto, a habilidade das células dendríticas em promover uma resposta imune aos antígenos expressos pelas células apoptóticas pode ser um mecanismo útil na terapia contra tumores (MADENA; GODSON, 2003).

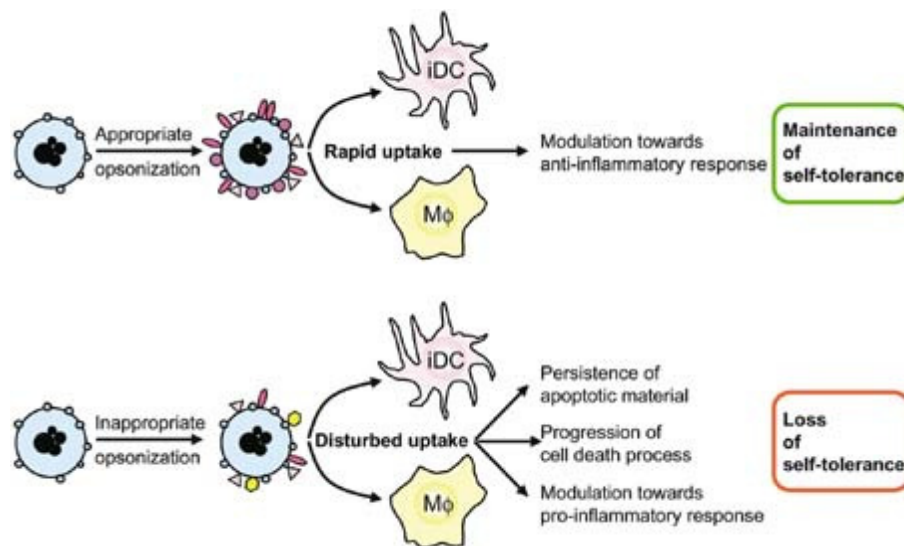


Figura 1.5. Uma rápida ingestão de células apoptóticas por fagócitos conduz a uma resposta anti-inflamatória e à manutenção da tolerância ao próprio. Ao contrário, se a fagocitose destas células for prejudicada por algum motivo, como a opsonização inapropriada, ocorrerá uma perda da tolerância ao próprio, podendo ocorrer o desenvolvimento de doenças autoimunes (ROOS *et al.*, 2004).

Portanto, a fagocitose de células apoptóticas é um processo vital na homeostase celular em todos os tecidos, e principalmente em respostas inflamatórias.

Logicamente, falhas no processo de morte celular, no processo de remoção destas células apoptóticas ou nos caminhos de sinalização intracelular do macrófago, perturbarão o processo normal, conduzindo a uma ativação do macrófago excessiva ou inadequada, com a consequência de uma inflamação persistente e exacerbada (DUFFIELD, 2003).

1.2.2. RECONHECIMENTO E INGESTÃO DAS CÉLULAS APOPTÓTICAS

Sinais de “find me”

Embora a maioria dos tipos celulares seja provavelmente capaz de fagocitar material apoptótico *in vivo* (KERR *et al*, 1972), os fagócitos profissionais, como macrófagos e células dendríticas imaturas, são os principais responsáveis pela remoção de células apoptóticas em mamíferos. No entanto, como as células que estão morrendo e os fagócitos não se localizam intimamente próximos, surge a questão: como os fagócitos encontram as células apoptóticas em tempo antes que elas sofram necrose secundária? Lauber e colaboradores responderam esta questão ao mostrarem a secreção do lipídio lisofosfatidilcolina (LPC) como um sinal de atração solúvel pelas células apoptóticas, o qual direciona o macrófago para o sítio de ação. Este fator solúvel é liberado pela fosfolipase A2 independente de cálcio citosólico (iPLA2), a qual é ativada pela clivagem dependente de caspase-3 (LAUBER *et al*, 2004). Entretanto, não se sabe como a LPC gerada na camada interna da membrana plasmática transloca para a camada externa e finalmente é secretada. Além disso, Ravichandran (2003) identificou um suposto receptor para LPC nos fagócitos, o G2A, o qual é acoplado à proteína G, assim como receptores para outras quimiocinas.

Embora os autores pudessem identificar uma concentração de LPC no sobrenadante de células apoptóticas, esta foi muito menor do que a concentração necessária para haver o mesmo nível de migração dos fagócitos. Uma possível explicação para esse resultado é que a LPC poderia ser convertida a outros produtos por componentes do soro. Alternativamente, a LPC poderia facilitar a migração do fagócito em conjunto com outras moléculas também derivadas das células apoptóticas (RAVICHANDRAN, 2003). Outros grupos de investigadores têm mostrado a liberação de fatores protéicos que atraem os fagócitos, nomeados dímero protéico ribossomal S19, “split human tyrosyl-tRNA synthetase” e trombospondina-1, corroborando esta última hipótese (revisado por LAUBER *et al.*, 2004).

Sinais de “eat me” e “don’t eat me”

As células senescentes são reconhecidas por alterações específicas nos marcadores de superfície celular que ocorrem por oxidação ou por modificações nos carboidratos ou na carga durante o processo apoptótico (LAUBER *et al.*, 2004). Um evento inicial bem reconhecido neste processo é a oxidação dos fosfolipídios e posterior perda de sua assimetria na membrana celular, conduzindo à exposição de fosfolipídios tais como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e fosfatidilserina na camada externa da membrana (ROOS *et al.*, 2004). Este evento envolve a simultânea inibição da aminofosfolipídio translocase – a qual é essencial para a manutenção da assimetria dos fosfolipídios na membrana – e a ativação da fosfolipídio “scramblase” - que facilita o movimento bidirecional de todas as classes de fosfolipídios através da bicamada (KAGAN *et al.*, 2003). A exposição de fosfolipídios também é facilitada pelo transportador ABC1 (ATP-binding cassette 1), que desempenha uma função tanto nas

células fagocíticas como nas células alvo para uma eficiente fagocitose (MADERNA; GODSON, 2003).

Uma vez na superfície das células apoptóticas, os fosfolipídeos são o fator principal no reconhecimento pelos fagócitos. A fosfatidilserina (PS) é reconhecida por diferentes receptores nas células fagocíticas, o mais representativo deles é o receptor de PS clonado por Fadok e colaboradores (2000). Recentemente tem-se observado que a PS não se liga diretamente ao seu receptor, mas sim indiretamente através da anexina I, uma proteína intracelular que, durante o processo de apoptose, transloca do citosol para a placa rica em PS na camada externa da membrana plasmática (ARUR *et al*, 2003). A ligação do receptor de PS tem demonstrado ser um mecanismo primário para o bloqueio da liberação de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* e *in vivo* (SOMERSAN; BHARDWAJ, 2001).

Mecanismos de reconhecimento adicionais, especificamente em relação a macrófagos, têm sido descritos. Estes incluem as integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$, receptores “scavenger” das classes A e B (CD36), o receptor tirosina quinase Mer, o receptor de $\beta2$ -glicoproteína I, CD14, os receptores para componentes do complemento CR3, CR4 e receptor de C1q, transportador ABC1, receptor de manose e receptores de colectina (revisado por FADOK *et al.*, 2001).

Surpreendentemente, a ligação individual ou múltipla destes receptores com células apoptóticas causou a interação, mas pouca internalização destas células. Ao contrário, a ligação apenas do receptor de PS não promoveu nem a interação nem a internalização. Entretanto, a ligação do receptor de PS e de outros receptores resultou na ingestão da célula. Baseado neste estudo, Somersan e Bhardwaj (2001) propuseram um novo paradigma para a ingestão de células apoptóticas: o mecanismo de “tether and tickle”, que postula que a variedade dos sinais de “eat me” garante o reconhecimento das células apoptóticas pelos

fagócitos, enquanto a interação da PS externalizada com o receptor de PS é responsável pela “côcega” no fagócito necessária para que ocorra a completa internalização e a simultânea secreção de citocinas imunossupressoras.

Além disso, os próprios macrófagos demonstraram apresentar PS em sua superfície, o que é requerido para a fagocitose de alvos que também expressem este fosfolípido (KAGAN *et al.*, 2003). A partir destas observações, surge a questão de como as células que expressam o sinal comum dependente de PS podem escapar do reconhecimento do macrófago. Uma especulação é que a sinalização pela extenalização de PS deva depender da densidade deste fosfolípido na superfície, já que quantidades baixas ou intermediárias de PS ou a sua exposição transitória não foi suficiente para promover a remoção. Alternativamente, células não apoptóticas positivas para PS devem falhar em expressar cofatores adicionais necessários, tais como mediadores quimiotáticos ou ligantes acessórios (tal como PS oxidada), requeridos para a estimulação dos macrófagos (KAGAN *et al.*, 2003).

Além dos receptores na membrana dos fagócitos, um número de proteínas solúveis se liga à PS e pode atuar como uma ponte entre células apoptóticas e fagócitos, tais como β 2-glicoproteína 1, Gas6 (growth arrest-specific gene 6) que se liga à Mer quinase, proteína S, trombospondina, a qual se liga nos fagócitos através do complexo α v β 3/CD36 e MFG-E8 (milk-fat globule epidermal growth factor 8) que se liga ao receptor α v β 3. Algo extremamente interessante é que a fonte de MFG-E8 seja o próprio macrófago ativado (revisado por MADERNA; GODSON, 2003).

Alguns dados sugerem uma função para componentes do complemento como C1q (OGDEN *et al.*, 2001) e iC3b (TAKIZARA *et al.*, 1996) na opsonização de certas células apoptóticas, promovendo seu reconhecimento acelerado. A ligação de autoanticorpos IgM às células apoptóticas deve ser responsável pela maior parte da ligação de C1q e ativação do

complemento (ROOS *et al.*, 2004). Além do complemento, as pentraxinas soro amilóide P (SAP), proteína reativa C (CRP) e pentraxina-3 (PTX3), geradas durante inflamação aguda, também opsonizam células apoptóticas tardias (ou células necróticas pós-apoptóticas) através do reconhecimento de autoantígenos nucleares e outras micropartículas que são liberadas pela célula durante a morte. Estas pentraxinas promovem a ingestão destas células através de receptores Fc γ RI e Fc γ RIII nos macrófagos (MOLD *et al.*, 2002) bem como a ligação secundária de C1q e ativação do complemento. A susceptibilidade de pacientes com deficiência nestes opsonizadores à doença autoimune renal no lupus eritematoso sistêmico, deve ser parcialmente explicado pelo excesso de células apoptóticas livres não ingeridas no glomérulo inflamado (GILES *et al.*, 2000). Camundongos com defeitos no receptor Mer, na forma secretada de IgM ou no receptor da LPC também mostram autoimunidade (revisado por LAUBER *et al.*, 2004).

MBL (mannan-binding lectin) também pode se ligar às células apoptóticas via seu domínio lectina. Entretanto, esta interação não conduz à ativação do complemento. Outros membros da família de colectinas incluem as proteínas surfactantes A (SP-A) e D (SP-D), as quais também promovem a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos humanos e de ratos (ROOS *et al.*, 2004).

A calreticulina pode se ligar às colectinas - C1q, MBL, SP-A e SP-D - e também ao receptor nos fagócitos CD91, o qual medeia a fagocitose. Desta forma, o complexo CD91-calreticulina atua como um receptor de colectina na superfície dos macrófagos e pode mediar a fagocitose de células apoptóticas opsonizadas com C1q, MBL, SP-A ou SP-D (Figura 6) (ROOS *et al.*, 2004).

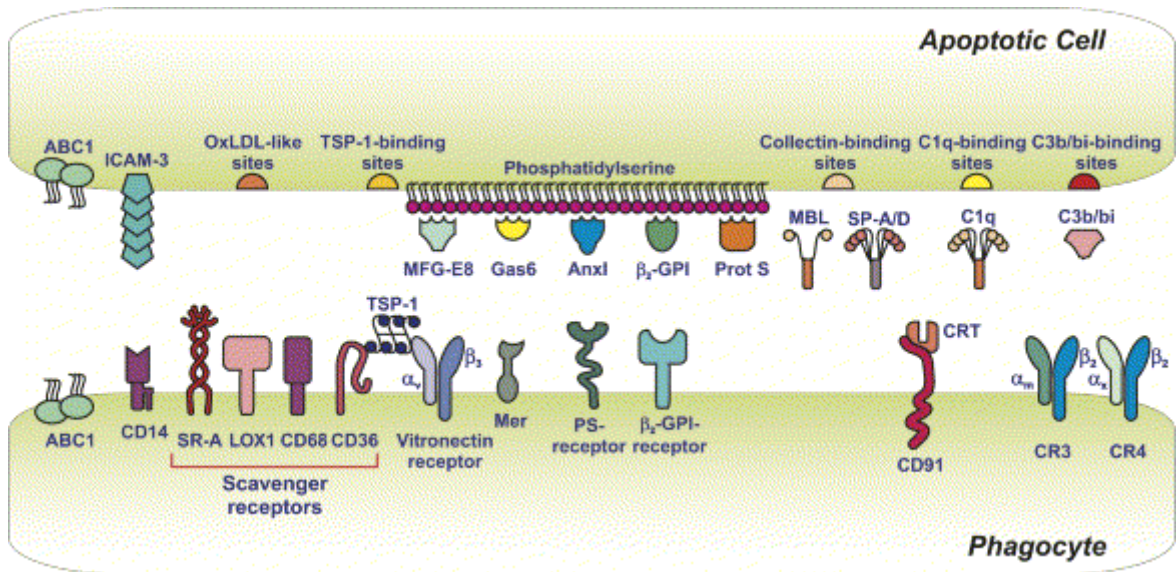


Figure 1.6. A sinapse de engolfamento. A célula apoptótica expõe vários sinais que são reconhecidos direta ou indiretamente via diferentes moléculas e diferentes receptores. ABC1: ATP binding-cassette-transporter 1; AnxI: Anexina I; β_2 -GPI: β_2 -glycoprotein-I; C1q: proteína do complemento C1q; C3b/bi: proteína do complemento C3b/bi; CD14: receptor de lipopolisacarídeo; CD91: receptor de calreticulina; CR3: complement receptor 3; CR4: complement receptor 4; CRT: calreticulina; Gas6: growth arrest-specific 6; ICAM-3: intercellular adhesion molecule 3; LOX1: receptor de lipoproteína oxidada; MBL: mannose binding lectin; Mer: receptor-tirosina-quinase; MFG-E8: milk-fat-globule-EGF-factor 8; OxLDL: oxidized low-density lipoprotein particle; Prot S: proteína S; PS: phosphatidylserine; SP-A/D: surfactant protein A or D; SR-A: scavenger receptor; TSP-1: thrombospondin-1 (LAUBER *et al.*, 2004).

A ligação de SAP, à fosfatidiletanolamina, e de C1q às células apoptóticas iniciais é muito mais fraca do que a ligação às apoptóticas tardias, e a ligação de MBL e PTX3 foi exclusivamente demonstrada nestas células com estágio de morte mais avançado (ROOS *et al.*, 2004). Como consequência da ativação do complemento, a deposição de C4 e C3 também é um evento tardio durante a apoptose. É difícil estimar como células apoptóticas tardias ocorreriam *in vivo*, porém, como camundongos e humanos deficientes em C1q, mostram impedimento na remoção de células apoptóticas e são fortemente susceptíveis à autoimunidade (ROOS *et al.*, 2004), a contribuição do C1q no sistema de remoção é aparentemente importante.

Embora tenha sido amplamente assumido que fagócitos são hábeis a reconhecer alterações na membrana plasmática que distinguem células apoptóticas de suas vizinhas viáveis, torna-se possível que os fagócitos também respondam a uma perda de sinais que caracterizem interações entre células viáveis.

Recentes dados evidenciam a presença de um sinal repulsivo entre leucócitos. Brown e colaboradores (2002) observaram que os receptores de superfície celular CD31, localizados tanto nos macrófagos como nas células apoptóticas, se ligam firmemente através de interação homofílica, mediando assim, o reconhecimento. A mesma interação entre os mesmos receptores em células vivas não resulta em ligação.

Análises mais detalhadas das modificações de proteínas da membrana no decorrer da apoptose provavelmente elucidará se há marcadores adicionais que possam contribuir para a proteção de células não-apoptóticas de serem acidentalmente ingeridas vivas.

A descoberta da relação entre esta variedade de moléculas com o reconhecimento de células apoptóticas sugere uma redundância funcional considerável nos caminhos moleculares que são usados na remoção fagocítica; isto talvez garanta que a eliminação de células apoptóticas não seja comprometida por mutações genéticas em qualquer um dos caminhos (GILES *et al.*, 2000).

O reconhecimento individual não é totalmente independente do tipo de célula fagocítica e/ou célula apoptótica alvo. Isto é observado, por exemplo, em um estudo no qual anticorpos para CD14 foram pobres inibidores da ingestão de neutrófilos apoptóticos, mas bons inibidores do reconhecimento de linfócitos apoptóticos. Fagócitos de diferentes tecidos e/ou de diferentes espécies também podem utilizar diferentes caminhos, o que foi observado *in vitro* em um trabalho no qual a exposição da PS (fosfatidilserina) foi implicada no

reconhecimento de leucócitos apoptóticos por macrófagos inflamatórios de camundongo, mas não por macrófagos derivados de monócitos humanos (revisado por SAVILL *et al.*, 2002).

A eficiência da interiorização de células apoptóticas também depende se os macrófagos são estimulados a reconhecer PS. Macrófagos não estimulados reconhecem neutrófilos apoptóticos, por exemplo, pela rota $\alpha v\beta 3/CD36$ /trombospondina, pelo sistema “scavenger” e pelo sistema de lectina, enquanto macrófagos estimulados podem passar a reconhecer PS e lipoproteína de baixa densidade oxidada, utilizando-se principalmente destas vias (MESSMER; PFEILSCHIFTER, 2000).

Uma melhor compreensão e a manipulação dos defeitos na remoção de células apoptóticas e na sua sinalização inibitória, tal como deficiência em C1q, deve conduzir a novas intervenções terapêuticas no futuro para doenças inflamatórias.

Sinalização intracelular

A maioria das descobertas sobre eventos de sinalização intracelular na fagocitose de células apoptóticas vem de experimentos realizados em *Caenorhabditis elegans*. Neste nematódeo os genes de fagocitose caem em dois conjuntos parcialmente redundantes: (1) ced-1, ced-6, ced7 e (2) ced-2, ced-5, ced-10, ced-12 (REDDIEN *et al.*, 2001).

Ced1, ced-6 e ced-7 codificam uma proteína transmembrana semelhante ao receptor scavenger, uma proteína adaptadora contendo domínio de ligação à proteína e um transportador ABC, respectivamente. Interessantemente, no nematódeo, um gene funcional ced-7 é requerido em ambos alvo e célula fagocítica para uma ingestão efetiva, uma situação também observada para ABC1 em células de mamíferos (REDDIEN *et al.*, 2001).

Ced2, Ced5, Ced10 e Ced12 codificam os homólogos de mamíferos Crk, Dock180, Rac e ELMO, respectivamente, e funcionam na célula fagocítica transduzindo outro sinal de célula apoptótica desconhecido até o citoesqueleto de actina. Em células de mamíferos, ced-12/ELMO1 cooperam funcionalmente com CrkII e DOCK180 upstream de ced-10/Rac1, conduzindo ao rearranjo do citoesqueleto (REDDIEN *et al.*, 2001).

Além de ser dependente de energia e requerer os elementos do citoesqueleto intactos, a ingestão de neutrófilos apoptóticos por macrófagos também necessita da ação da proteína quinase C e de tirosinas quinases *in vitro* (GILES *et al.*, 2000).

Entretanto, mais análises bioquímicas e genéticas dos caminhos de sinalização que controlam a ingestão de células apoptóticas serão necessárias para uma melhor compreensão destes processos fundamentais.

1.2.3 MECANISMOS REGULATÓRIOS DA FAGOCITOSE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS

Embora muitos caminhos moleculares pelos quais fagócitos reconhecem células apoptóticas terem sido identificados, os mecanismos que controlam a capacidade fagocítica para a remoção destas células são menos compreendidos. Certamente, se a indução de caminhos apoptóticos é alvo para uma potencial terapia contra câncer e doenças inflamatórias, uma estratégia paralela para maximizar a fagocitose também é requerida para se evitar as conseqüências deletérias do acúmulo de células necróticas secundárias (GILES *et al.*, 2001).

Sabe-se que a capacidade para fagocitose de células que estão morrendo é influenciada por mediadores solúveis, tais como citocinas (REN; SAVILL, 1995), lipoxinas (MADERNA; GODSON, 2003), prostaglandinas (ROSSI *et al.*, 1998) e glicocorticóides (LIU *et al.*, 1999).

A cultura de macrófagos derivados de monócitos com GM-CSF, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α ou TGF- β 1 por 4 horas aumentou significativamente a fagocitose de neutrófilos apoptóticos. Embora em roedores IFN- γ parece ter efeitos inibitórios (REN; SAVILL, 1995). IFN- β também teve seu efeito estimulatório sobre a fagocitose mediada por micróglia (CHAN *et al.*, 2003). Estes resultados devem sugerir um mecanismo de “feedback” das citocinas pró-inflamatórias no controle da reação autoimune. A citocina do tipo Th2 (IL-4), no entanto, reduziu a quantidade de células apoptóticas ingeridas por micróglia (MAGNUS *et al.*, 2002).

As lipoxinas são formadas por leucócitos durante interação célula-célula sob uma variedade de condições, incluindo inflamação, e elas representam uma classe única de mediadores lipídicos com potente ação anti-inflamatória. Foi observado que a fagocitose de polimorfonucleares apoptóticos é estimulada por lipoxinas, a qual é mediada por proteína quinase C e PI-3 quinase (fosfatidil inositol) e associada ao aumento na produção de TGF- β . Este mecanismo regulatório mostrou ser independente do receptor de PS (MADERNA; GODSON, 2003).

Alguns pesquisadores observaram que a elastase, uma protease intracelular que é liberada por células inflamatórias nas vias aéreas durante inflamação pulmonar, cliva o receptor de PS na superfície dos fagócitos, contribuindo assim para a queda na remoção de células apoptóticas (KAGAN *et al.*, 2003). Como a fagocitose de células apoptóticas estimulada por lipoxinas parece ser independente do receptor de PS, uma potencial função terapêutica das lipoxinas em doenças pulmonares com inflamação excessiva tem sido sugerida (MADERNA; GODSON, 2003).

As prostaglandinas PGE₂ e PGD₂ reduzem a proporção de macrófagos que fagocitam células apoptóticas especificamente pela elevação intracelular de cAMP, o qual está associado com a redistribuição das proteínas do citoesqueleto, incluindo actina, talina e paxilina e com

alterações morfológicas profundas indicativas de mudanças na função adesiva do macrófago (ROSSI *et al.*, 1998).

O primeiro estudo dos efeitos de glicocorticóides sobre o processo fagocítico de células apoptóticas foi feito por Liu e colaboradores (1999), o qual mostrou que o tratamento de fagócitos (macrófagos derivados de monócitos humanos, células mesangiais, e macrófagos elicitados do peritônio ou derivados da medula óssea de camundongos) por 24 horas com metilprednisolona, dexametasona e hidrocortisona potencializou a fagocitose de células apoptóticas (neutrófilos, eosinófilos e células T Jukart), com o requerimento da síntese de proteínas. A fagocitose aumentada por metilprednisolona falhou em estimular a liberação das quimiocinas IL-8 e MCP-1 pelos fagócitos, mas não suprimiu a liberação destas quimiocinas após a fagocitose de zymosan opsonizado.

A maior capacidade fagocítica induzida por glicocorticóides resultou de mudanças na reorganização dos elementos do citoesqueleto dependente de adesão do macrófago. Dessa forma, os macrófagos tiveram altos níveis de Rac ativo, reduzida fosforilação de paxilina e PYK2 (os quais são importantes componentes da adesão) e queda na expressão de p130CAS, um mediador da sinalização relacionado à adesão (GILES *et al.*, 2001).

HLA-DR, Fc γ RIII e CD163 foram expressos em níveis elevados em macrófagos tratados com dexametasona, enquanto a expressão de CD44, CD44v3, ICAM-1 e integrina β 3 foi significativamente reduzida. Estas alterações nas moléculas de superfície e na capacidade de reorganização do citoesqueleto e dos caminhos de sinalização relacionados à adesão induzidas por glicocorticóides parecem ser importantes na eficiente ingestão fagocítica das células apoptóticas (GILES *et al.*, 2001).

Entretanto, estudos feitos com glicocorticóides sintéticos apresentam algumas limitações, já que eles podem ser expelidos de dentro dos leucócitos. Além disso, seus efeitos requerem muitas horas de tratamento (LIU *et al.*, 1999).

Portanto, mais estudos são requeridos para estabelecer se estas descobertas podem ser extrapoladas para condições inflamatórias *in vivo*, as quais são evidentemente mais complexas, e a definição das influências regulatórias *in vivo* será crucial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas futuras para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas e autoimunes.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência do estresse por baixas temperaturas na capacidade dos macrófagos para realizarem a ingestão de timócitos apoptóticos. Desta forma, os objetivos específicos foram:

(1) Observar efeitos do estresse agudo (por 4 horas) e também de um estresse hiperagudo (por 10 minutos), já que efeitos rápidos do estresse têm sido observados em trabalhos realizados por Baccan e colaboradores (2004).

(2) Correlacionar os níveis plasmáticos de corticosterona, epinefrina e norepinefrina com os efeitos do estresse sobre as funções dos macrófagos, já que eles são os principais hormônios liberados durante o estresse.

(3) Comparar as mudanças nas funções de macrófagos residentes da cavidade peritoneal do camundongo com as de macrófagos ativados com LPS, já que estas células têm mostrado respostas inversas sob influência do estresse em alguns trabalhos como o de Baccan (2004), no qual situações de estresse têm provocado um aumento da função imune de macrófagos ativados, enquanto possuem efeito imunossupressor sobre macrófagos não ativados.

(4) Analisar a interação do timócito apoptótico com o macrófago (fase de reconhecimento), e o seu processo de interiorização, já que estes são os principais fatores celulares envolvidos no processo da fagocitose.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais:

Para todos os experimentos, foram utilizados camundongos machos BALB/c pesando aproximadamente 25g obtidos do biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica em temperatura (25°C) e período de luz controlados e com água e alimento à vontade.

3. 2. Exposição dos animais a condições de estresse:

Uma semana antes dos experimentos, os camundongos foram separados e mantidos separadamente em cada gaiola, de forma a evitar o estresse no momento da retirada dos animais. Foram utilizadas duas condições de estresse por baixa temperatura: (1) estresse hiperagudo, no qual os animais foram incubados em gaiolas de dimensões padronizadas a -15°C durante 10 minutos e (2) estresse agudo por incubação dos animais a 4°C por um período de 4 horas, sendo os macrófagos peritoneais retirados imediatamente após esta incubação.

3. 3. Isolamento dos timócitos e indução de apoptose:

Após sua remoção, o timo foi macerado em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 2% de soro bovino fetal (FBS) inativado (Gibco), penicilina (0,1g/L),

estreptomicina (0,1g/L), bicarbonato de sódio (2,2g/L) e piruvato de sódio (0,11g/L) para se obter uma suspensão de timócitos. Estes foram cultivados em meio com dexametasona (Sigma; concentração final de 1 μ M) a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 3 horas para induzir apoptose, como descrito por Licht e colaboradores (1999). Este tempo relativamente pequeno para obtenção da apoptose foi escolhido com a finalidade de minimizar a quantidade de células que sofreram necrose secundária. Desta forma, a quantidade de células apoptóticas iniciais obtidas foi de aproximadamente 25%, enquanto a de células necróticas e apoptóticas tardias foi menor que 4%.

Após a lavagem por centrifugação para a retirada do FBS e da dexametasona, os timócitos foram ressuspensos em meio com 2% de FBS (utilizados no ensaio da fagocitose) ou em meio com 0,4% de soro albumina bovina (BSA - Sigma) (utilizados no ensaio da interação). Devido à ausência de interiorização (mas não de interação) das células apoptóticas sob condições livres de soro, a interação e a fagocitose podem ser estudadas separadamente neste sistema como descrito por Lich *et al* (1999) sem a necessidade de bloquear a internalização por métodos mais artificiais.

A apoptose foi determinada quantitativamente por citometria de fluxo após a adição de anexina V-FITC juntamente com iodeto de propídeo (R&D Systems). A anexina V-FITC se liga à fosfatidilserina nas células que estão morrendo (apoptóticas e necróticas), enquanto o iodeto de propídeo cora o DNA, mas por ser uma molécula relativamente grande, ele só penetra nas células cuja membrana plasmática já perdeu a integridade (Vermes *et al*, 1995). Desta forma, como é possível ver na figura 3.1, as células duplo negativas são células vivas; as duplo positivas são células necróticas e apoptóticas tardias; enquanto as que são anexina-V positivas e iodeto de propídeo negativas, são as apoptóticas iniciais.

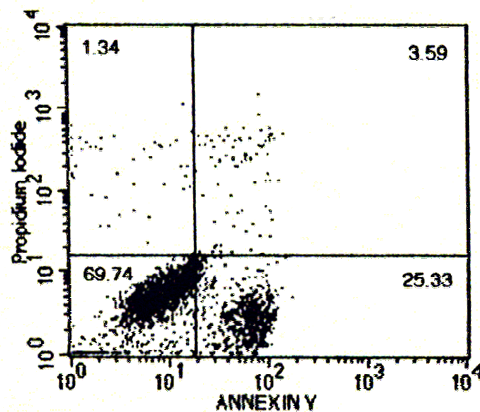


Figura 3.1. Timócitos tratados com dexametasona por 3 horas.

3. 4. Isolamento e ativação de macrófagos peritoneais:

Os camundongos foram sacrificados por inalação de clorofórmio imediatamente após o estresse. Os macrófagos foram colhidos injetando-se 3 mL de solução balanceada de Hank na cavidade peritoneal do camundongo, e a suspensão celular obtida foi adicionada à superfície de lamínulas de vidro para a aderência dos macrófagos por 15 minutos, como descrito por Mantovani (1987). Estas lamínulas foram lavadas em solução de Hank para a remoção de células não aderentes. Para a realização dos experimentos com macrófagos ativados, os camundongos foram estimulados com 50µg de LPS (diluído em 500µL de PBS) intraperitonealmente 4 dias antes da exposição ao estresse e realização do experimento. Já a ativação *in vitro* foi feita cultivando-se os macrófagos em meio com 10ng/ml de LPS durante 5 ou 24 horas antes da exposição aos hormônios do estresse.

3. 5. Ensaio de fagocitose e de interação:

As lamínulas contendo os macrófagos aderidos foram colocadas em placas de 24 poços, onde os timócitos (2×10^6 /mL) foram adicionados, e então, as células foram cultivadas por 45 minutos a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂.

As lamínulas imersas em meio contendo soro foram enxaguadas com uma lavagem vigorosa utilizando-se uma pipeta para remover os timócitos não fagocitados (inclusive os ligados). Quando o meio não continha o soro, resultando apenas de interação, as lamínulas foram lavadas suavemente em 0.4% de BSA para a remoção dos timócitos não ligados, como descrito por Licht e colaboradores (1999). As células foram fixadas com glutaraldeído a 2% e coradas com Giemsa.

Para avaliar os resultados, foram contados em um dado campo microscópico: 200 macrófagos, avaliando-se quantos destes estavam fagocitando (ou com células aderidas) e quantos timócitos fagocitados (ou aderidos) existiam. O resultado foi expresso em porcentagem de fagocitose e número médio de timócitos fagocitados (ou aderidos) por macrófago.

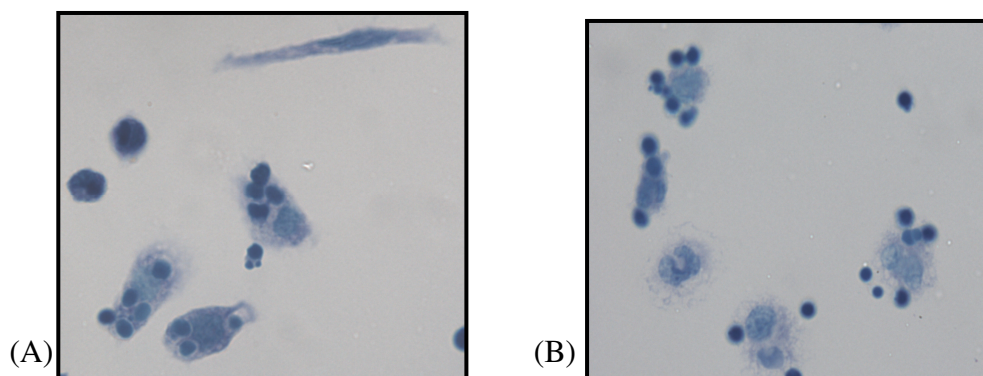


Figura 3.2. Macrófagos com timócitos apoptóticos fagocitados em meio RPMI com 2% de FBS (A) e macrófagos com timócitos apoptóticos aderidos em meio com 0,4%BSA (B).

3. 6. Dosagem dos hormônios após o estresse:

Para correlacionar os níveis plasmáticos de corticosterona, de epinefrina e norepinefrina com os efeitos do estresse sobre a fagocitose, estes hormônios foram dosados após a indução de cada condição de estresse e, então, estas concentrações foram utilizadas para a realização de experimentos *in vitro*.

Os grupos de camundongos controles, submetidos ao estresse hiperagudo e os submetidos ao estresse agudo, foram decapitados e tiveram o sangue colhido com heparina. Após centrifugação, 25 μ L do plasma foram adicionados a 1 ml de etanol para a extração dos esteróides. Já para a dosagem de catecolaminas, foi adicionado ao plasma metabissulfito de sódio para evitar a oxidação.

A concentração de corticosterona foi determinada por radioimunoensaio como descrito por Vecsei (1979). Desta forma, os anticorpos de coelho anti-corticosterona e a corticosterona ^3H foram adicionados à amostra, assim, o hormônio da amostra compete com o hormônio

marcado radiativamente pela ligação ao anticorpo. Como resultado desta competição, a porcentagem do hormônio marcado ligado ao anticorpo diminui gradativamente à medida que a concentração do hormônio não marcado aumenta progressivamente. Adiciona-se, então, carvão ativado ao qual se absorve um polissacarídeo sintético, dextran, que se deixa penetrar pelas pequenas moléculas de antígeno livres. Estas são separadas por centrifugação magnética, deixando no sobrenadante os imunocomplexos de corticosterona (marcada e da amostra).

A quantificação é feita no sobrenadante (fase que contém os imunocomplexos) por contagem dos eventos do decaimento radioativo em um contador centilográfico. O número de cpm das amostras é comparado com os dos padrões, inferindo a concentração dos desconhecidos. Quanto maior a medida radioativa, mais corticosterona ^3H se ligou ao anticorpo, o que significa que havia menos corticosterona no plasma.

Para a dosagem das catecolaminas plasmáticas, os animais foram sacrificados por decapitação e o plasma contendo metabissulfito de sódio, para evitar a oxidação, foi armazenado à -70°C . Conforme descrito por Garófalo e colaboradores (1996), as catecolaminas foram purificadas através da adsorção em alumina em pH 8.8 e dihidroxibenzilamina foi utilizada como padrão interno. Após a lavagem, elas foram eluídas com o uso de uma solução de HCl 0,1 N contendo EDTA e metabissulfito de sódio e dosadas através de HPLC (high-performance liquid chromatograph), utilizando-se detecção eletroquímica e colunas de octadesilsilano (ODS-C18).

3. 7. Efeito da corticosterona e das catecolaminas sobre a fagocitose:

A partir da determinação dos níveis plasmáticos de corticosterona, epinefrina e norepinefrina após os dois diferentes tipos de estresse, foram realizados experimentos *in vitro* para avaliar se as mudanças nos níveis destes hormônios estão relacionadas, separadamente ou em conjunto, com a mudança na capacidade fagocítica do macrófago.

Os macrófagos foram cultivados por 4 horas (estresse agudo) em meio contendo 0,2µg/mL de corticosterona (Sigma), 8ng/mL de epinefrina (Sigma) ou 11ng/mL de norepinefrina (Sigma), separadamente ou em conjunto. As lamínulas foram lavadas em solução de Hank e os ensaios de fagocitose e de interação foram realizados imediatamente após.

3.8. Fagocitose mediada pelo receptor para complemento:

Para verificar a ativação de macrófagos estimulados com LPS *in vitro* por 24 horas, foi feito um ensaio de fagocitose com imunocomplexo de IgM opsonizado com complemento, já que macrófagos ativados fagocitam pelo receptor de complemento (C3b / C3bi), enquanto macrófagos normais não conseguem internalizar estas partículas (Mantovani, 1981).

Os imunocomplexos foram preparados por incubação de uma solução de hemácias de carneiro a 0,4% em Hanks com IgM de coelho anti-hemácia de carneiro (1:333) durante 30 minutos a 37°C e mantidas “overnight” a 3°C. Soro de camundongo, utilizado como fonte de complemento, foi adicionado ao imunocomplexo lavado numa diluição de 1:160 e esta solução, agora chamada de EAC (eritrócito – anticorpo – complemento), foi incubada a 37°C por 10 minutos. O EAC foi lavado e utilizado imediatamente no ensaio de fagocitose.

Os macrófagos aderidos em lamínulas foram incubados com o EAC por 30 minutos a 37°C. Após este período de fagocitose, as lamínulas foram lavadas e mantidas em PBS diluído em água (1:5) por 45 segundos e em seguida lavadas em PBS. Esse choque hipotônico é utilizado para que ocorra a lise das hemácias não fagocitadas (Mantovani, 1972).

Os macrófagos foram fixados com glutaraldeído a 2%, corados com Giemsa e a fagocitose foi quantificada.

3. 9. Efeitos dos hormônios sobre a apoptose dos timócitos:

Para verificar o efeito dos hormônios liberados durante o estresse sobre a apoptose de timócitos, estes foram cultivados por 4 horas com (1) meio, como controle negativo; (2) dexametasona, como controle positivo; (3) corticosterona; (4) epinefrina; (5) norepinefrina; (6) as catecolaminas em conjunto; e (7) uma combinação dos três hormônios. O resultado foi analisado por citometria de fluxo por adição de anexina-V-FITC e iodeto de propídeo como descrito anteriormente.

3. 10. Bloqueio do receptor de glicocorticóide:

O antagonista do receptor de glicocorticóide, RU486, foi utilizado para verificar a participação deste receptor nos efeitos observados com a administração de corticosterona. Para isso, os macrófagos ativados com LPS *in vivo* foram cultivados com o RU486 (Sigma) em uma concentração 11,1 vezes a concentração de corticosterona 30 minutos antes da adição deste hormônio (Liu *et al*, 1999), o qual permaneceu em cultura por 4 horas. As lamínulas

com macrófagos foram lavadas em solução de Hank, cocultivadas com timócitos apoptóticos em meio contendo 2% de FBS por 45 minutos e a fagocitose foi quantificada.

3. 11. Utilização de competidores da fagocitose de células apoptóticas:

Competidores de alguns receptores envolvidos com a fagocitose de células apoptóticas foram utilizados com a finalidade de verificar se o efeito observado da corticosterona sobre a fagocitose foi devido à ação deste hormônio em um destes receptores. Para tal, os macrófagos ativados com LPS *in vivo* foram cultivados em meio contendo 0,2µg/mL de corticosterona por 4 horas. Após a lavagem das lamínulas com solução de Hank, foi adicionado ao poço 500 µL de meio RPMI contendo um dos competidores: 1mg/mL de N-acetilglicosamina (Sigma), 1mg/mL de manan (Sigma), ou 500µg/mL de dextran sulfato (Sigma) (Schlegel et al, 2000), os quais permaneceram por 15 minutos, e então, timócitos apoptóticos foram adicionados (sem a retirada dos competidores) e o ensaio de fagocitose foi realizado e quantificado. A N-acetilglicosamina compete com a fagocitose de células apoptóticas por se ligar a receptores lectina; mannan se liga a receptores de manose; e dextran é ligante do receptor *scavenger*.

3. 12. Análise estatística:

A comparação entre as médias dos resultados de dois grupos foi feita pelo teste *t de Student* (quando os dados passaram pelo teste de normalidade e igual variância) ou pelo teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, com a utilização do programa Sigma Stat. Já para comparar mais de dois grupos, o teste utilizado foi o teste ANOVA, que também foi realizado através do mesmo programa.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do estresse sobre a fagocitose e interação:

Com o intuito de avaliar o papel do estresse na fagocitose e na interação dos timócitos apoptóticos por macrófagos, camundongos foram submetidos a dois tipos de estresse: o estresse hiperagudo (-15°C por 10 minutos) e o agudo (4°C por 4 horas). O estresse **hiperagudo** (-15°C por 10 minutos) não causou alteração nem na fagocitose nem na interação de timócitos apoptóticos por macrófagos não ativados (figura 4.1). O mesmo ocorreu com macrófagos ativados com LPS quatro dias antes do estresse (figura 4.2).

Já o estresse **agudo** (4°C por 4 horas) não causou alteração na capacidade fagocítica de macrófagos não ativados (figura 4.3), mas diminuiu a porcentagem de fagocitose ($p = 0,005$) e o número médio de timócitos por macrófagos ativados com LPS ($p = 0,017$), sem alterar a sua interação (figura 4.4).

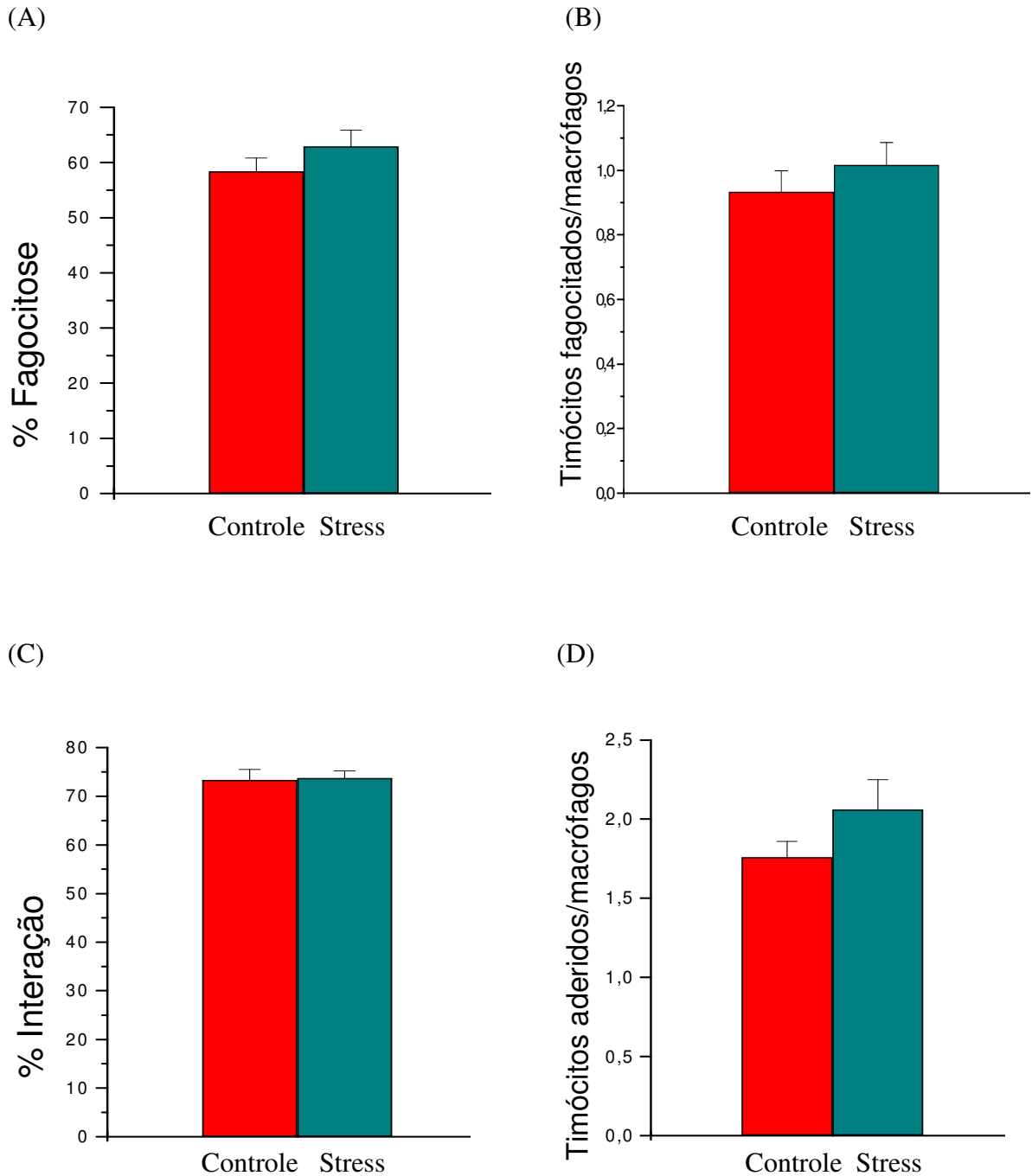


Figura 4.1. Capacidade fagocítica de **macrófagos residentes** da cavidade peritoneal de camundongos após o **estresse hiperagudo (-15°C por 10 minutos)**. (A) Porcentagem de fagocitose, (B) número médio de timócitos fagocitados por macrófagos totais, (C) porcentagem de interação e (D) número médio de timócitos aderidos por macrófagos totais. Os dados representam médias + erro padrão das médias; n = 10 (10 animais controles e 10 estressados no total de 3 experimentos independentes).

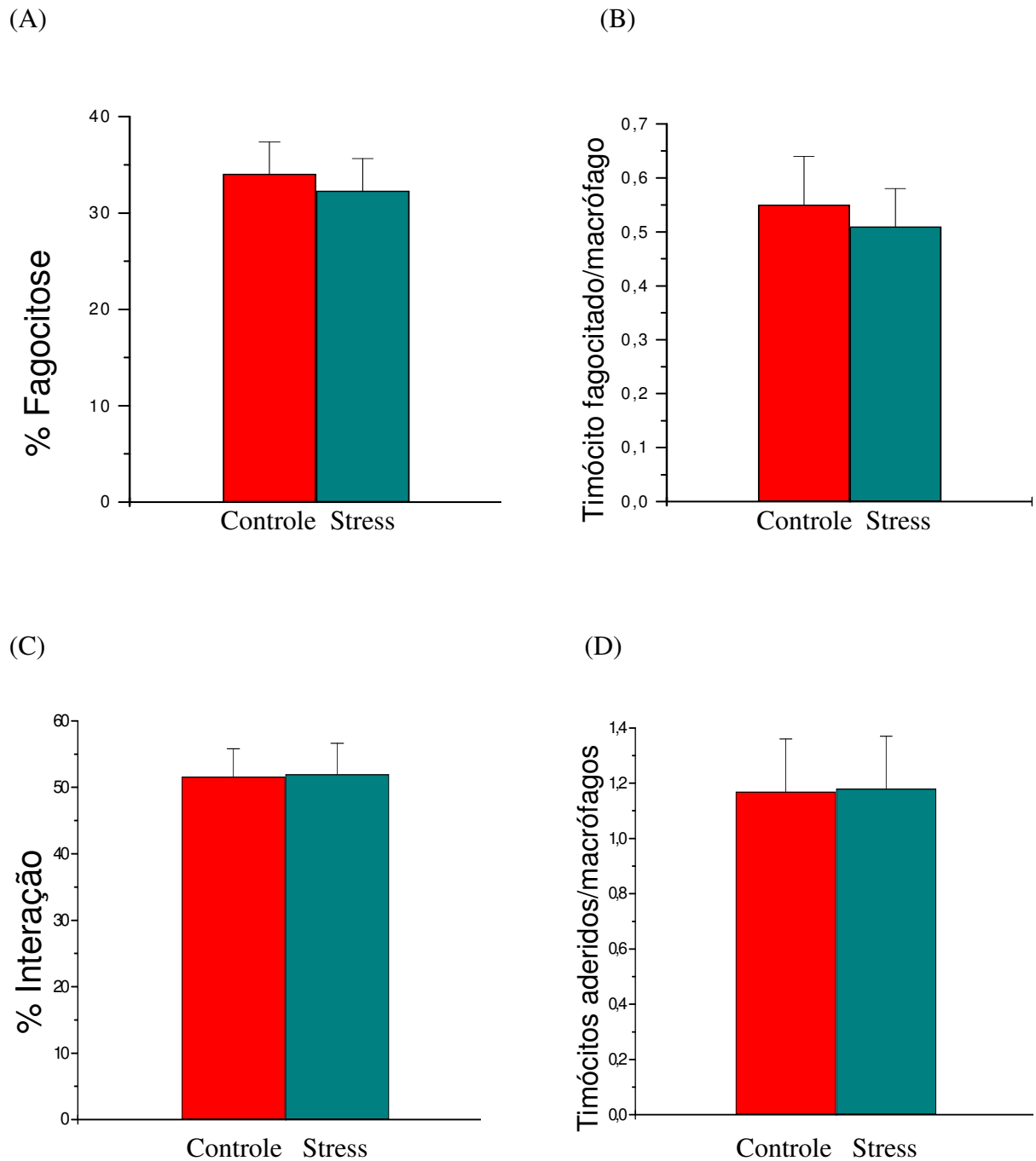
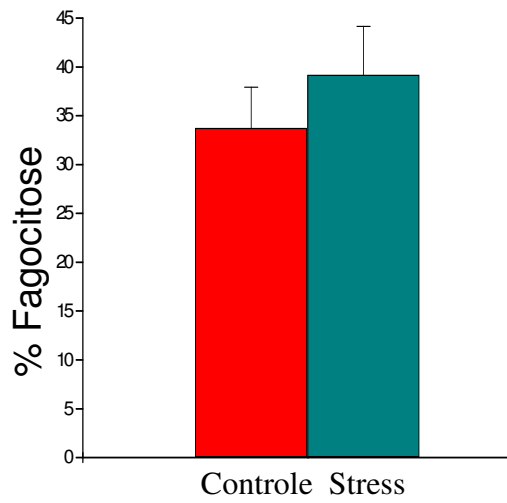
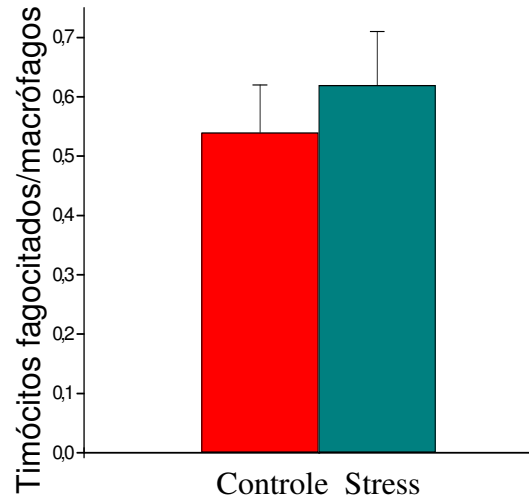


Figura 4.2. Capacidade fagocítica de **macrófagos peritoniais ativados com LPS** (*in vivo*) após o **estresse hiperagudo (-15°C por 10 minutos)**. (A) Porcentagem de fagocitose, (B) número médio de timócitos fagocitados por macrófagos totais, (C) porcentagem de interação e (D) número médio de timócitos aderidos por macrófagos totais. Os dados representam médias + erro padrão das médias; n = 8 (8 animais controles e 8 estressados no total de 3 experimentos independentes).

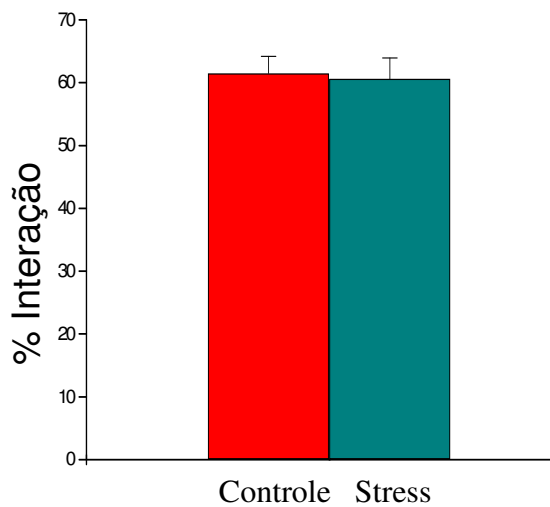
(A)



(B)



(C)



(D)

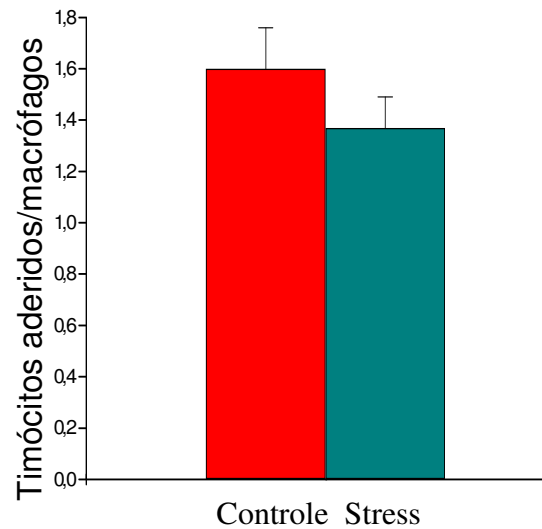


Figura 4.3. Capacidade fagocítica de **macrófagos residentes** da cavidade peritoneal de camundongos após o **estresse agudo (4°C por 4 horas)**. (A) Porcentagem de fagocitose, (B) número médio de timócitos fagocitados por macrófagos totais, (C) porcentagem de interação e (D) número médio de timócitos aderidos por macrófagos totais. Os dados representam médias + erro padrão das médias; n = 8 (8 animais controles e 8 estressados no total de 3 experimentos independentes).

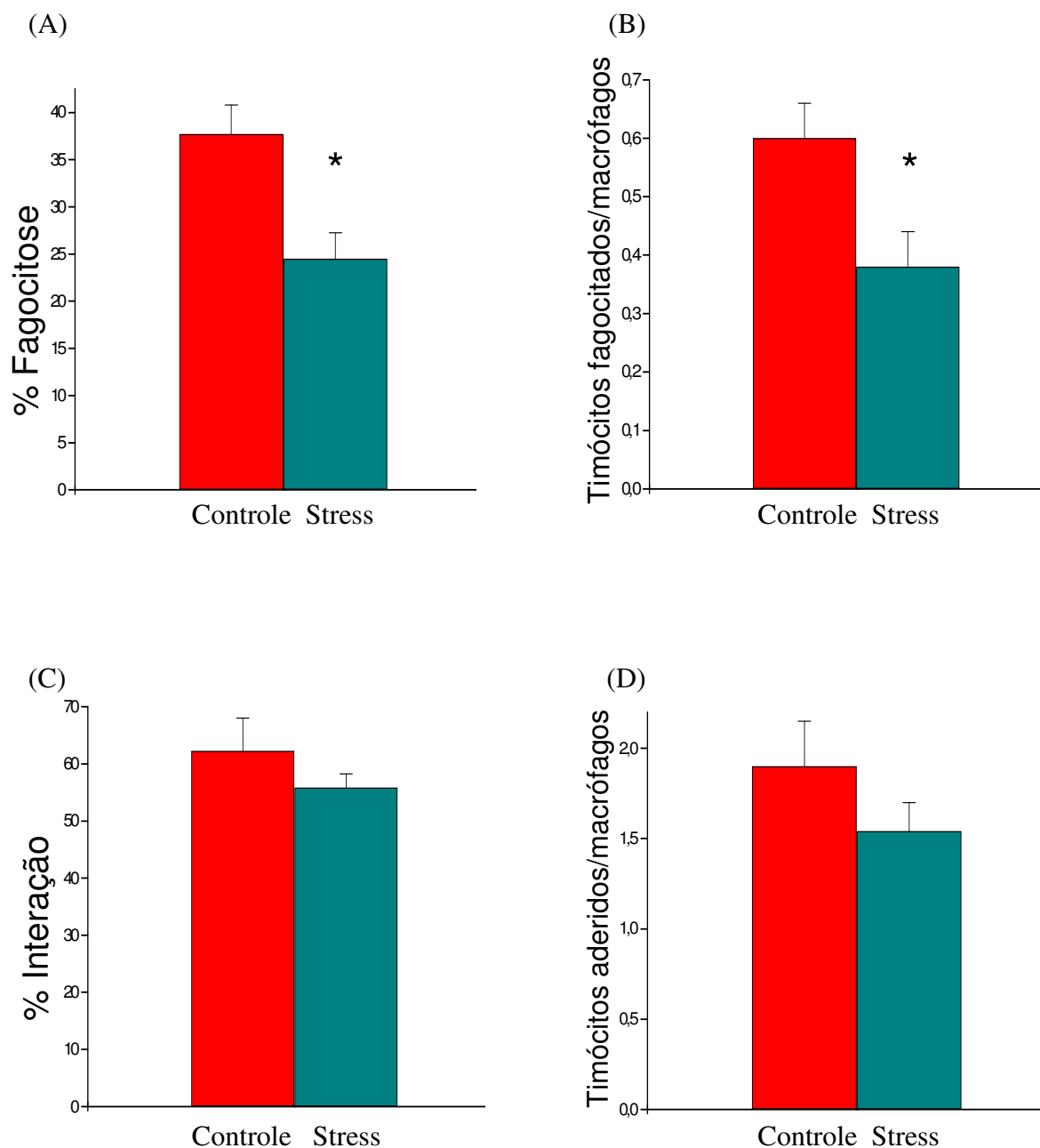


Figura 4.4. Capacidade fagocítica de **macrófagos peritoneais ativados com LPS** (*in vivo*) após o **estresse agudo (4°C por 4 horas)**. (A) Porcentagem de fagocitose, (B) número médio de timócitos fagocitados por macrófagos totais, (C) porcentagem de interação e (D) número médio de timócitos aderidos por macrófagos totais. Os dados representam médias + erro padrão das médias; n = 10 (10 animais controles e 10 estressados no total de 3 experimentos independentes). As barras mostradas com * apresentam diferença significativa com relação ao controle no teste t-student (para % de fagocitose, $p = 0,005$; para timócitos por macrófagos, $p = 0,017$).

4.2. Efeito do estresse sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona e catecolaminas:

Sabendo-se que o estresse inibe a fagocitose dos timócitos apoptóticos por macrófagos ativados, decidimos verificar se os principais hormônios liberados durante o estresse (corticosterona e catecolaminas) estão envolvidos nesta diminuição. Para isso, primeiramente estes hormônios foram dosados no plasma de camundongos submetidos ao estresse e foi observado que os dois tipos de estresse e a injeção de LPS provocaram o aumento das concentrações plasmáticas de corticosterona e das catecolaminas (figuras 4.5 e 4.6), exceto pelo estresse hiperagudo que não alterou significativamente as concentrações de norepinefrina (figura 4.6B).

As concentrações plasmáticas de corticosterona, epinefrina e norepinefrina de camundongos que sofreram a injeção de LPS e posterior estresse (hiperagudo ou agudo) não foram significativamente diferentes das concentrações plasmáticas dos camundongos que sofreram apenas o estresse (hiperagudo e agudo) (figuras 4.5 e 4.6), embora as concentrações destes hormônios tenham diferido entre o plasma de camundongos que tiveram a injeção de LPS e os controles. Uma exceção foi a concentração de corticosterona após a injeção de LPS e estresse hiperagudo que se distinguiu da concentração após apenas o estresse hiperagudo (figura 4.5).

Além disso, a concentração da epinefrina também não diferiu entre os camundongos que sofreram a injeção do LPS mais o estresse (hiperagudo e agudo) e os camundongos que tiveram apenas a injeção de LPS; já com relação às concentrações plasmáticas de corticosterona e de norepinefrina, estes mesmos valores foram diferentes. Isto mostra que o

LPS não alterou a liberação de epinefrina provocada pelo estresse, tanto hiperagudo quanto agudo (figura 4.6).

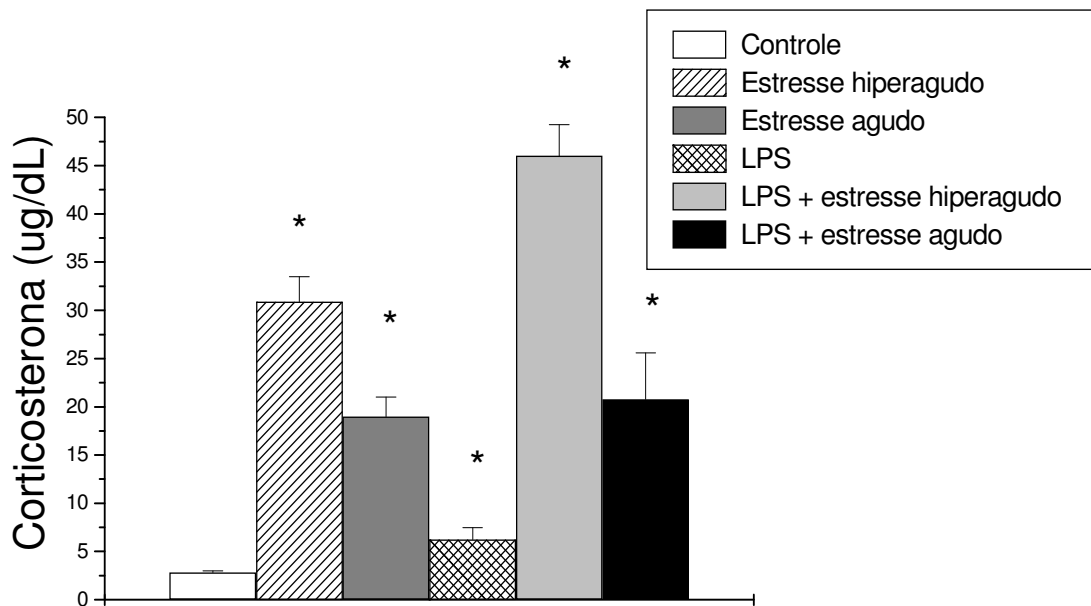
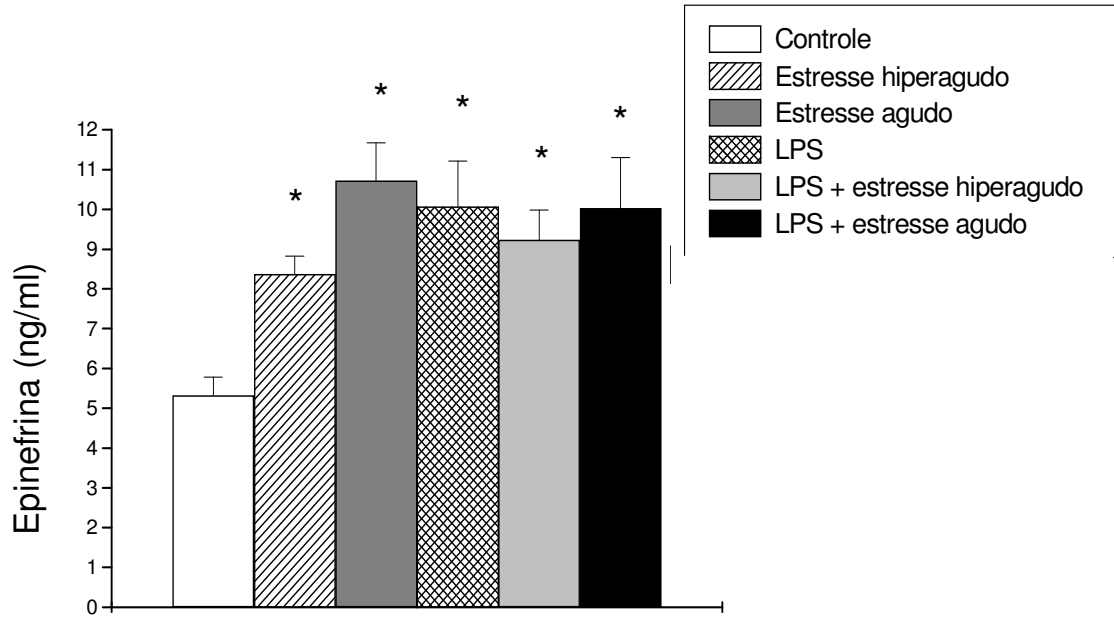


Figura 4.5. Efeito do estresse sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona. Estresse hiperagudo: -15°C por 10 minutos; estresse agudo: 4°C por 4 horas. Os resultados são mostrados como média + erro padrão, $n = 10$. As barras mostradas com * apresentam diferença significativa com relação ao controle (Os grupos foram comparados através do teste ANOVA com $p < 0,05$). Todos os outros grupos foram estatisticamente diferentes entre si, exceto pelos grupos estresse agudo e LPS + estresse agudo, os quais não foram diferentes.

(A)



(B)

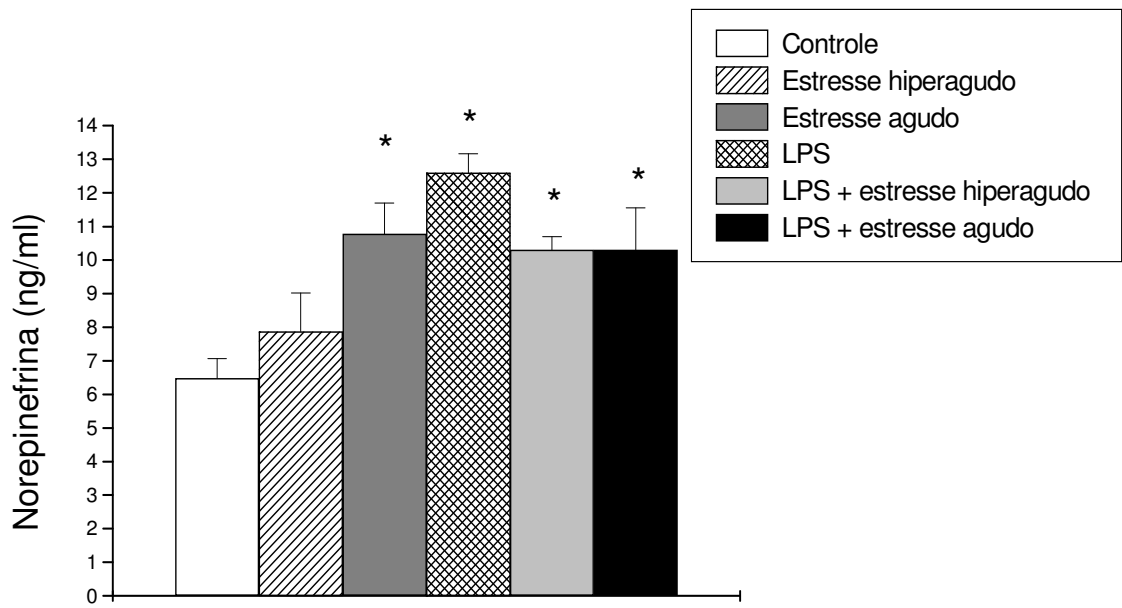


Figura 4.6. Efeito do estresse sobre as concentrações plasmáticas de epinefrina (A) e norepinefrina (B). Estresse hiperagudo: -15°C por 10 minutos; estresse agudo: 4°C por 4 horas. Os resultados são mostrados como média + erro padrão, $n = 5$ (composto de 3 animais cada). As barras mostradas com * apresentam diferença significativa em relação ao controle (Os grupos foram comparados através do teste ANOVA com $p < 0,05$).

4.3. Efeito da corticosterona e das catecolaminas na fagocitose e interação:

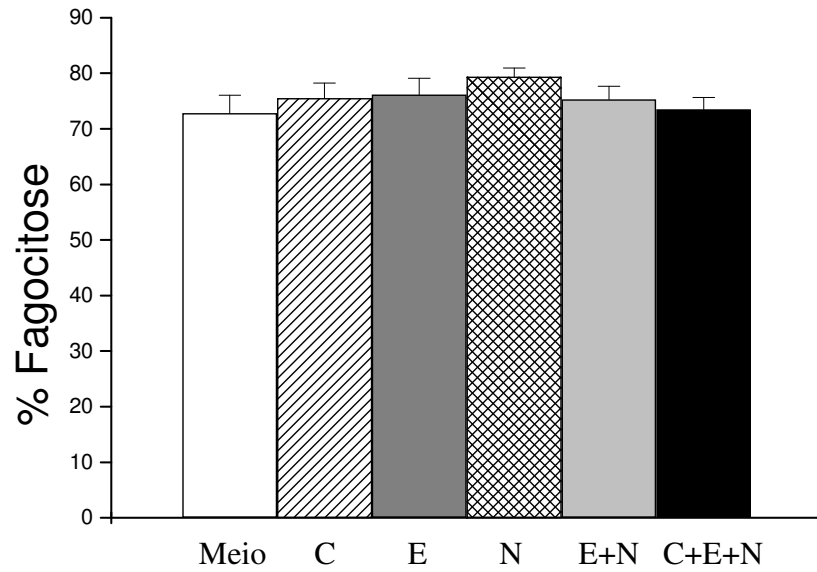
Visto que as concentrações plasmáticas de corticosterona e das catecolaminas foram aumentadas durante o estresse, estas mesmas concentrações foram adicionadas em cultura de macrófagos para se determinar o efeito de cada hormônio na diminuição da capacidade fagocítica após o estresse agudo.

Como esperado, a adição de corticosterona, epinefrina, norepinefrina ou uma combinação destes por 4 horas não alterou a capacidade fagocítica dos macrófagos não ativados (figura 4.7).

Quando os macrófagos foram ativados *in vitro* por 5 horas e cultivados com corticosterona, epinefrina ou norepinefrina separadamente ou em conjunto, também não houve alteração na fagocitose por macrófagos de timócitos apoptóticos (figura 4.8). Porém, ao observar estes macrófagos ao microscópio, pôde-se verificar que eles não tinham uma morfologia totalmente espalhada como aquela observada em macrófagos ativados *in vivo* (figura 4.11). Portanto, os macrófagos poderiam não estar totalmente ativados. Desta forma, o efeito dos hormônios sobre a fagocitose foi observado em macrófagos ativados *in vivo* por 4 dias.

Com os macrófagos ativados *in vivo*, foi observada uma diminuição na porcentagem de fagocitose e no número médio de timócitos por macrófagos com a adição de corticosterona ou os três hormônios em conjunto (figura 4.9). Nenhuma mudança foi mediada pelas catecolaminas. Desta forma, a diminuição sobre a fagocitose durante o estresse agudo foi atribuído, ao menos em parte, à corticosterona.

(A)



(B)

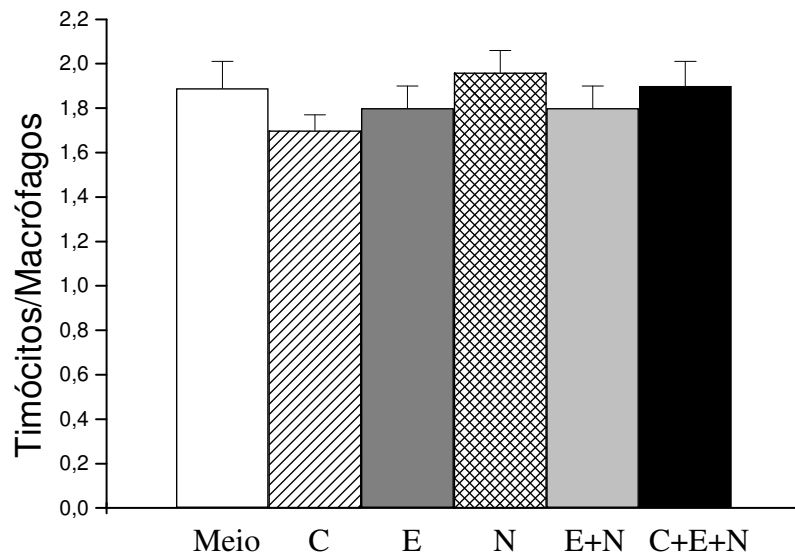
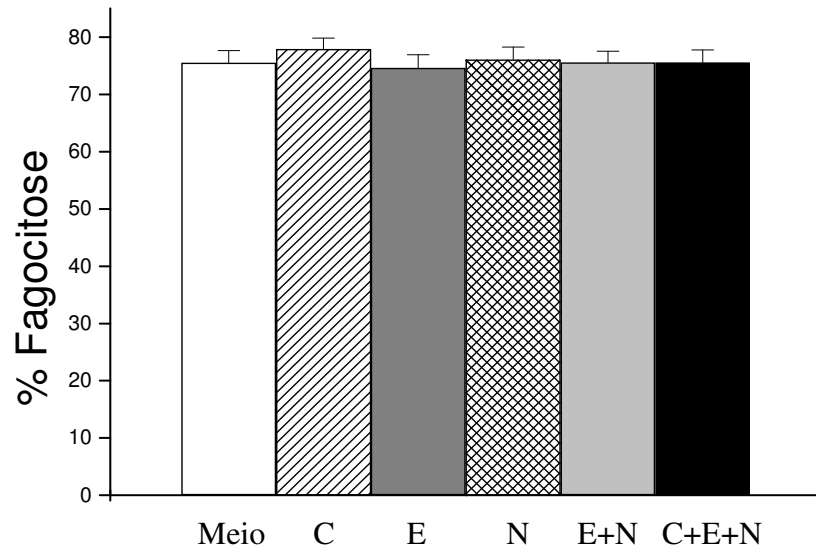


Figura 4.7. Capacidade fagocítica de **macrófagos residentes da cavidade peritoneal** após a cultura com os hormônios (corticosterona e catecolaminas) por 4 horas. (A) Porcentagem de fagocitose, (B) número médio de timócitos fagocitados por macrófagos totais. C: corticosterona; E: epinefrina; N norepinefrina. Os dados representam médias \pm erro padrão das médias; n = 9.

(A)



(B)

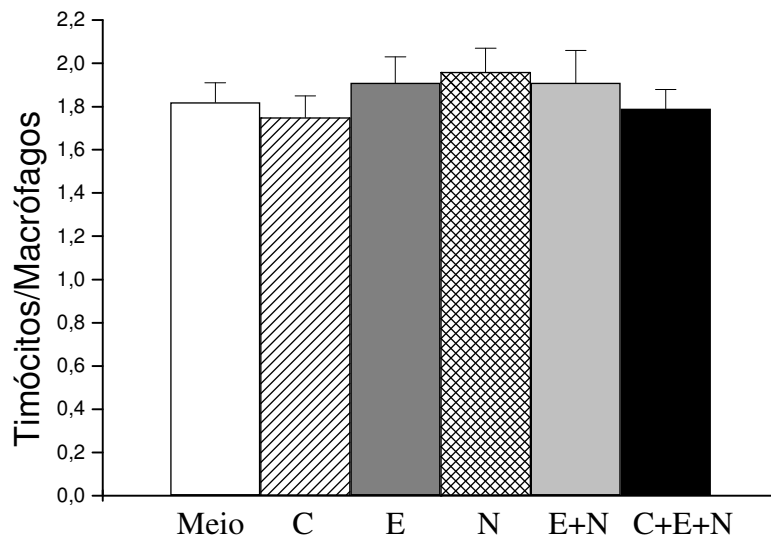
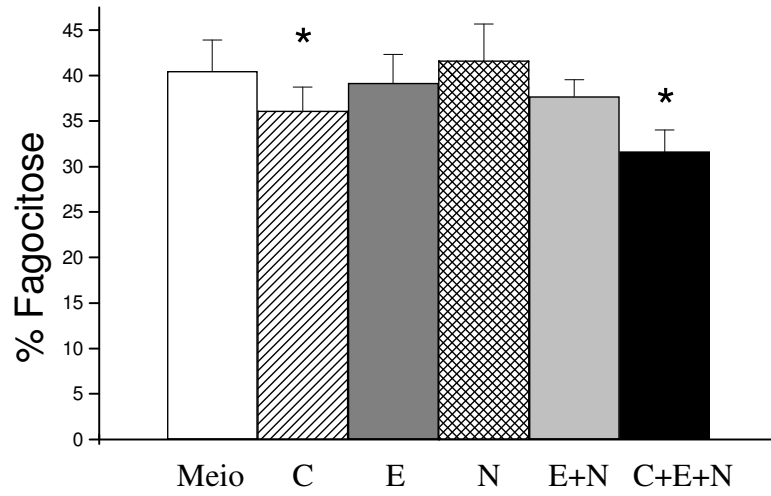


Figura 4.8. Capacidade fagocítica de **macrófagos peritoneais ativados com LPS (*in vitro* por 5 horas)** após a cultura com os hormônios (corticosterona e catecolaminas) por 4 horas. (A) porcentagem de fagocitose, (B) número médio de timócitos fagocitados por macrófagos totais. C: corticosterona; E: epinefrina; N norepinefrina. Os dados representam médias \pm erro padrão das médias; n = 9.

(A)



(B)

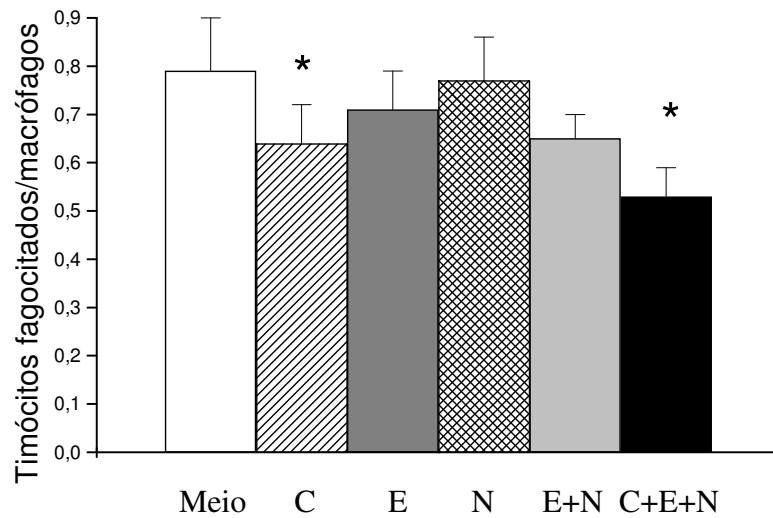


Figura 4.9. Capacidade fagocítica de **macrófagos peritoneais ativados com LPS (*in vivo*)** após a cultura com os hormônios (corticosterona e catecolaminas) por 4 horas. (A) Porcentagem de fagocitose, (B) número médio de timócitos fagocitados por macrófagos totais. C: corticosterona; E: apinefrina; N: norepinefrina. Os dados representam médias \pm erro padrão das médias; $n = 10$. As barras mostradas com * apresentam diferença estatisticamente significativa com relação ao controle (Teste ANOVA com $p < 0,05$).

No entanto, o fato de macrófagos ativados *in vitro* não terem se comportado como macrófagos ativados *in vivo* nos levou à seguinte questão: será que aqueles macrófagos ativados *in vitro* por 5 horas não tiveram a fagocitose diminuída após adição de corticosterona por que eles não estavam completamente ativados ou o LPS não age diretamente no macrófago para torná-lo sensível à corticosterona?

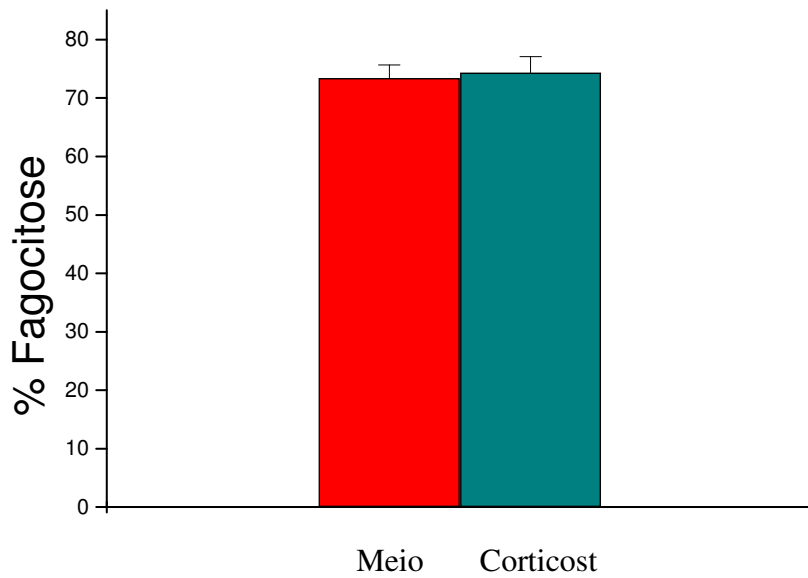
Para responder esta questão os macrófagos foram ativados *in vitro* por 24 horas, mas o resultado foi o mesmo para aqueles ativados *in vitro* por 5 horas, isto é, nenhum hormônio, nem a combinação deles alterou a fagocitose de timócitos apoptóticos (figura 4.10). A morfologia destes macrófagos ativados *in vitro* por 24h se mostra bem espaiada na figura 4.11 C. Pode também ser observado que estes macrófagos fagocitam imunocomplexo de IgM opsonizado com complemento, o que mostra que, durante este tempo, o LPS foi capaz de agir sobre o macrófago para promover sua ativação, mesmo não sendo capaz de torná-lo sensível à corticosterona.

4.4. Efeitos dos hormônios sobre a apoptose dos timócitos:

Uma vez que o aumento nas concentrações hormonais induzido pelo estresse é capaz de diminuir a capacidade fagocítica de timócitos apoptóticos, resolvemos verificar se estas mesmas concentrações são capazes de alterar a apoptose dos timócitos.

Como é possível observar pela figura 4.12, a adição *in vitro* das concentrações referentes ao estresse agudo de epinefrina ou corticosterona aumenta a apoptose dos timócitos, com $p = 0,029$ e $p = 0,019$ respectivamente.

(A)



(B)

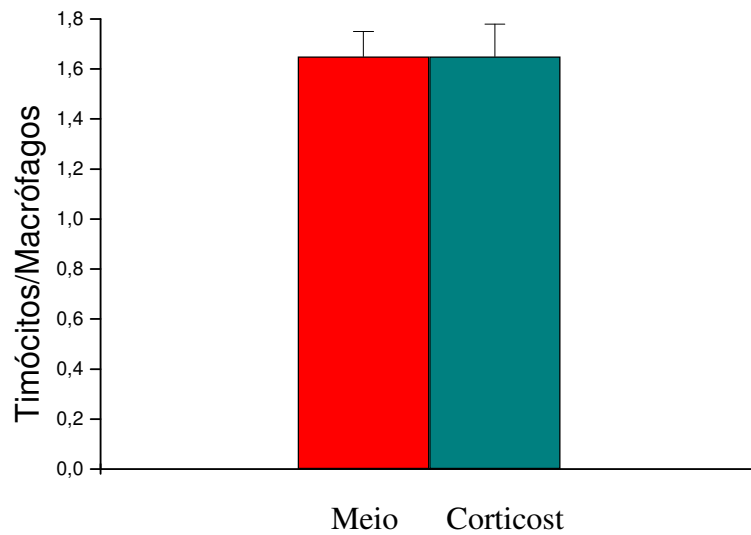


Figura 4.10. Capacidade fagocítica de **macrófagos peritoneais ativados com LPS (*in vitro* por 24 horas)** após a cultura com corticosterona por 4 horas. (A) Porcentagem de fagocitose, (B) número médio de timócitos fagocitados por macrófagos totais. Corticost: corticosterona. Os dados representam médias \pm erro padrão das médias; $n = 10$.

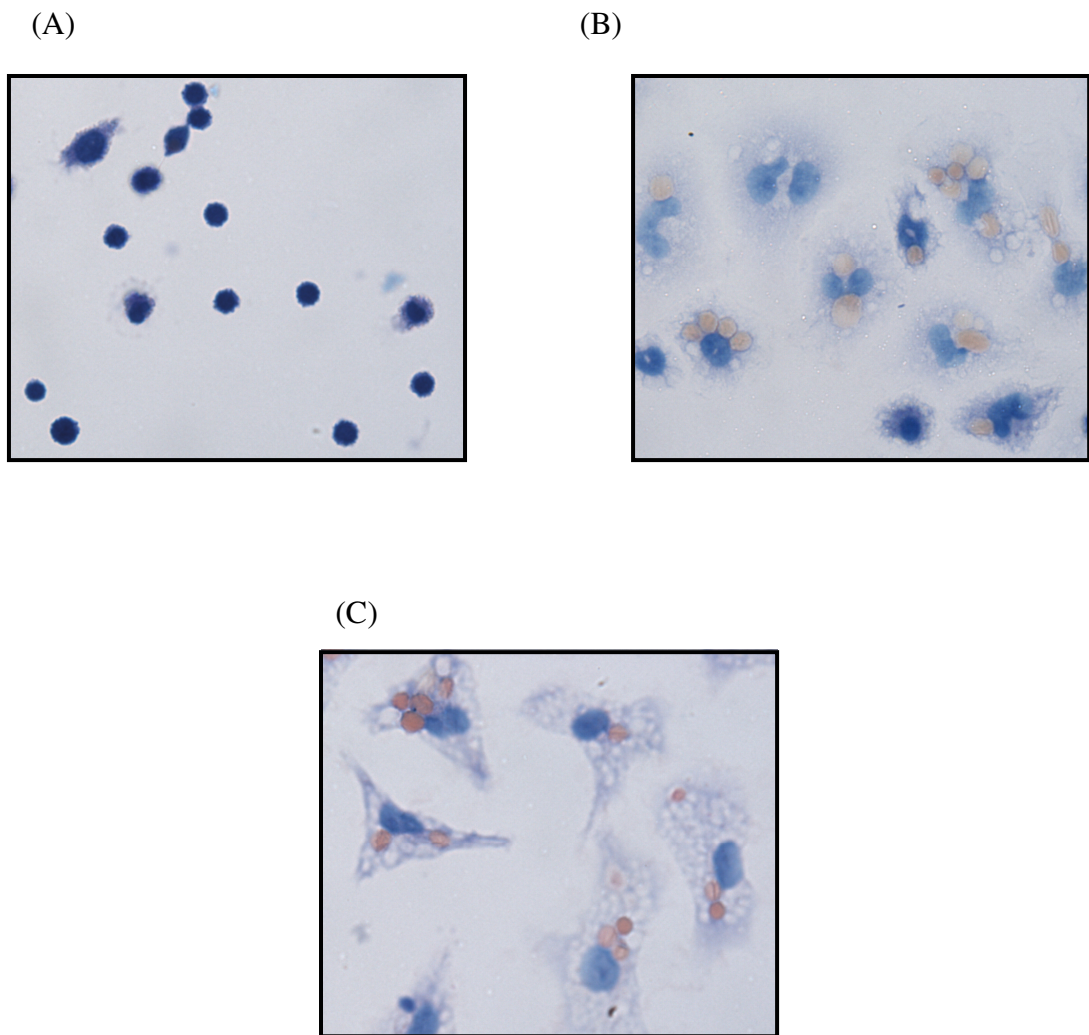


Figura 4.11. Morfologia e fagocitose de EAC observadas por microscópio óptico com objetiva de 100 dos macrófagos controles (A), ativados com LPS *in vivo* (B) e *in vitro* por 24 horas (C). A fagocitose dos macrófagos não estimulados foi de $2,4\% \pm 0,75$ (média \pm erro padrão da média; $n=3$); a dos macrófagos ativados com LPS *in vivo* foi de $24,5\% \pm 5,11$ ($n=3$); e a dos macrófagos ativados com LPS *in vitro* por 24 horas foi de $27,7 \pm 3,70$ ($n=5$).

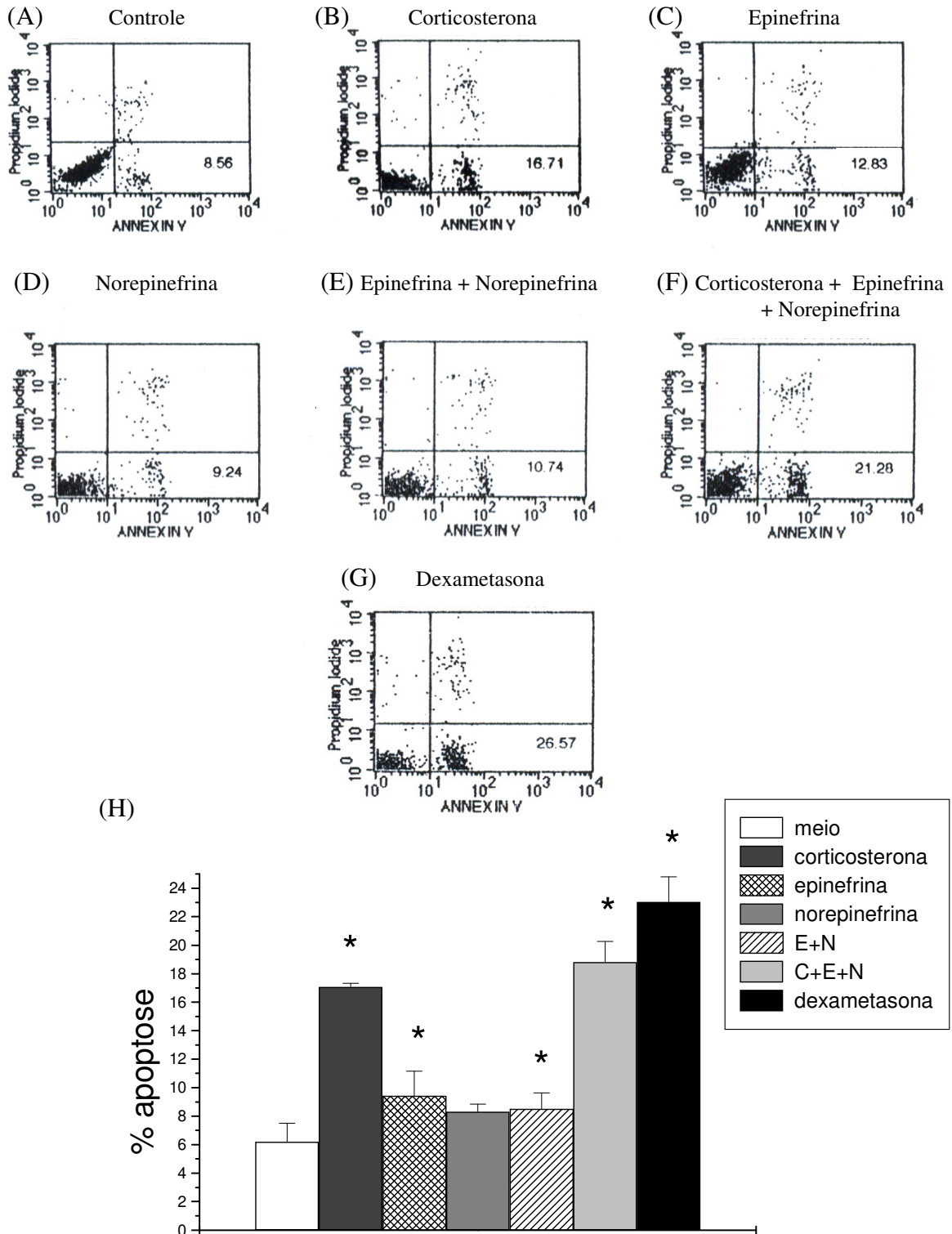


Figura 4.12. Efeito da corticosterona (C), epinefrina (E) e norepinefrina (N) na apoptose dos timócitos após 4 horas de cultura. A – G: experimento representativo; H: média + erro padrão de três experimentos independentes. As barras mostradas com * apresentam diferença estatisticamente significativa com relação ao controle (Teste ANOVA com $p < 0,05$).

4.5. Efeito do antagonista do receptor de glicocorticóides:

Para verificar por qual mecanismo a corticosterona estaria agindo na diminuição da capacidade fagocítica dos macrófagos, o antagonista do receptor de glicocorticóides, RU486, foi utilizado antes e durante a administração de corticosterona aos macrófagos ativados *in vivo*. Na figura 4.13 é possível observar que a utilização de RU486 em conjunto com a corticosterona impediu totalmente a diminuição na fagocitose promovida por este esteróide.

4.6. Efeito da corticosterona na alteração da ação de receptores envolvidos com a fagocitose de células apoptóticas:

Competidores pelos receptores envolvidos na fagocitose de células apoptóticas foram adicionados à cultura a fim de verificar se a diminuição na capacidade fagocítica induzida pelo tratamento com corticosterona foi devido a alguma alteração na ação destes receptores.

Para isso, os macrófagos ativados *in vivo* foram incubados: 1- com meio; 2- com corticosterona por 4 horas; 3- com um competidor antes e durante o ensaio de fagocitose; e 4- com corticosterona por 4 horas e com o competidor antes e durante o ensaio de fagocitose. Tanto a corticosterona como os competidores, adicionados separadamente, promoveram uma diminuição da fagocitose de timócitos apoptóticos com relação ao controle.

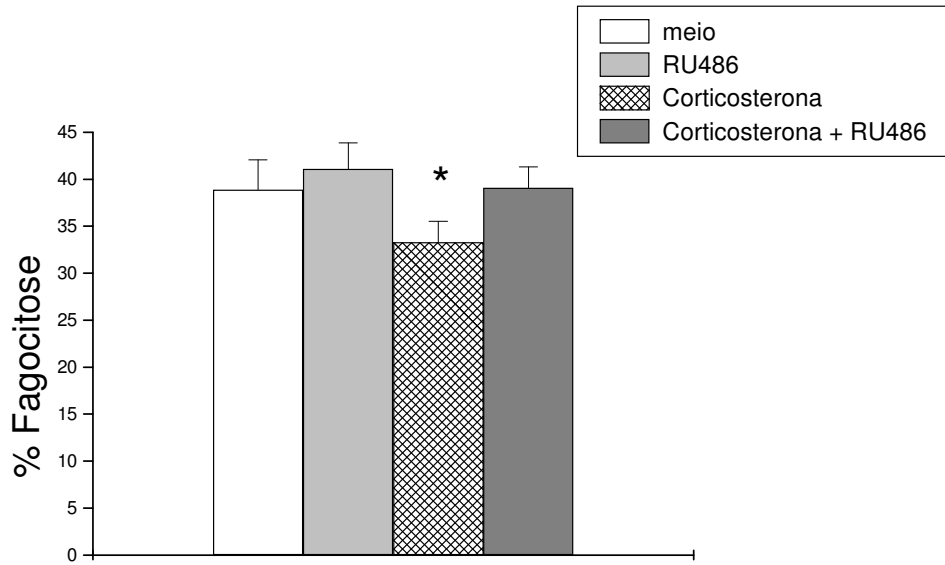
A diminuição na porcentagem de fagocitose dos macrófagos tratados com corticosterona e com o competidor (d3) foi comparada com a soma das diminuições na fagocitose promovida pela corticosterona e pelo competidor separadamente (d1 + d2) (Figura 4.14). Supondo-se que a diminuição na fagocitose promovida pela corticosterona não seja devido à alteração no receptor em questão, espera-se que d3 não seja estatisticamente

diferente de $d1 + d2$. Ao contrário, se esta diminuição fagocítica promovida pela corticosterona for, ao menos em parte, devido à alteração na ação do receptor em questão, espera-se que $d3$ seja menor que $d1 + d2$.

Observando a figura 4. 14, é possível verificar que a diminuição na porcentagem de fagocitose promovida pela corticosterona e o dextran em conjunto foi semelhante à diminuição promovida pela corticosterona mais a diminuição promovida pelo dextran, o que indica que o receptor ao qual este competidor se liga, ou seja, o receptor scavenger, não estaria envolvido na diminuição fagocítica induzida pela corticosterona. O mesmo ocorreu com a mannan, indicando que o receptor de manose também não estaria envolvido nesta inibição da corticosterona.

Já a diminuição na porcentagem de fagocitose promovida pela corticosterona e a N-acetilglicosamina em conjunto foi significativamente menor que a diminuição promovida pela corticosterona mais a diminuição promovida pela N-acetilglicosamina, o que indica que a diminuição de timócitos apoptóticos induzida pela corticosterona envolve, em parte, alteração na ação ou na expressão de receptores lectina, que não o receptor de manose.

(A)



(B)

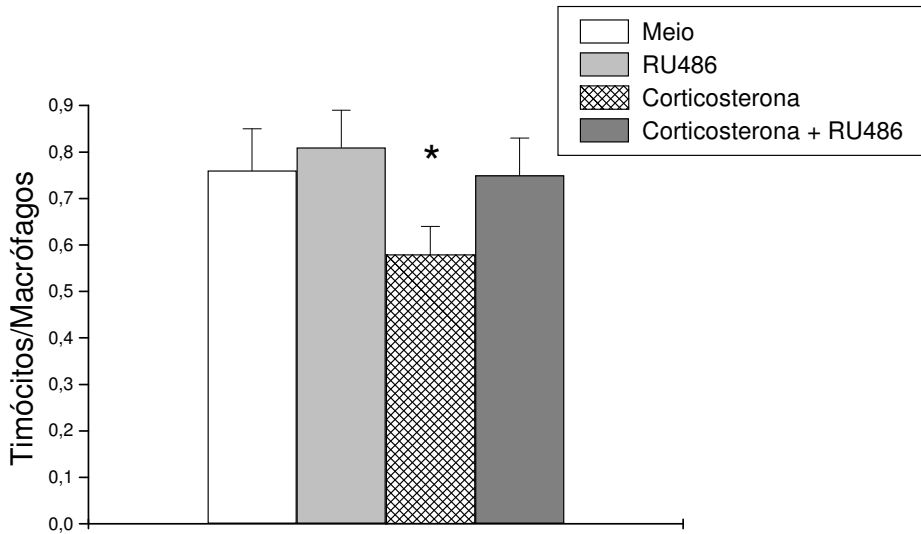


Figura 4.13. Capacidade fagocítica de **macrófagos peritoneais ativados com LPS** (*in vivo*) após a cultura com o antagonista do receptor de glicocorticóide, RU486, em conjunto com a corticosterona. (A) Porcentagem de fagocitose, (B) número médio de timócitos fagocitados por macrófagos totais. Os dados representam médias \pm erro padrão das médias; $n = 6$ (“pool” de 2 cada). As barras mostradas com * apresentam diferença estatisticamente significativa com relação ao controle (teste ANOVA com $p < 0,05$).

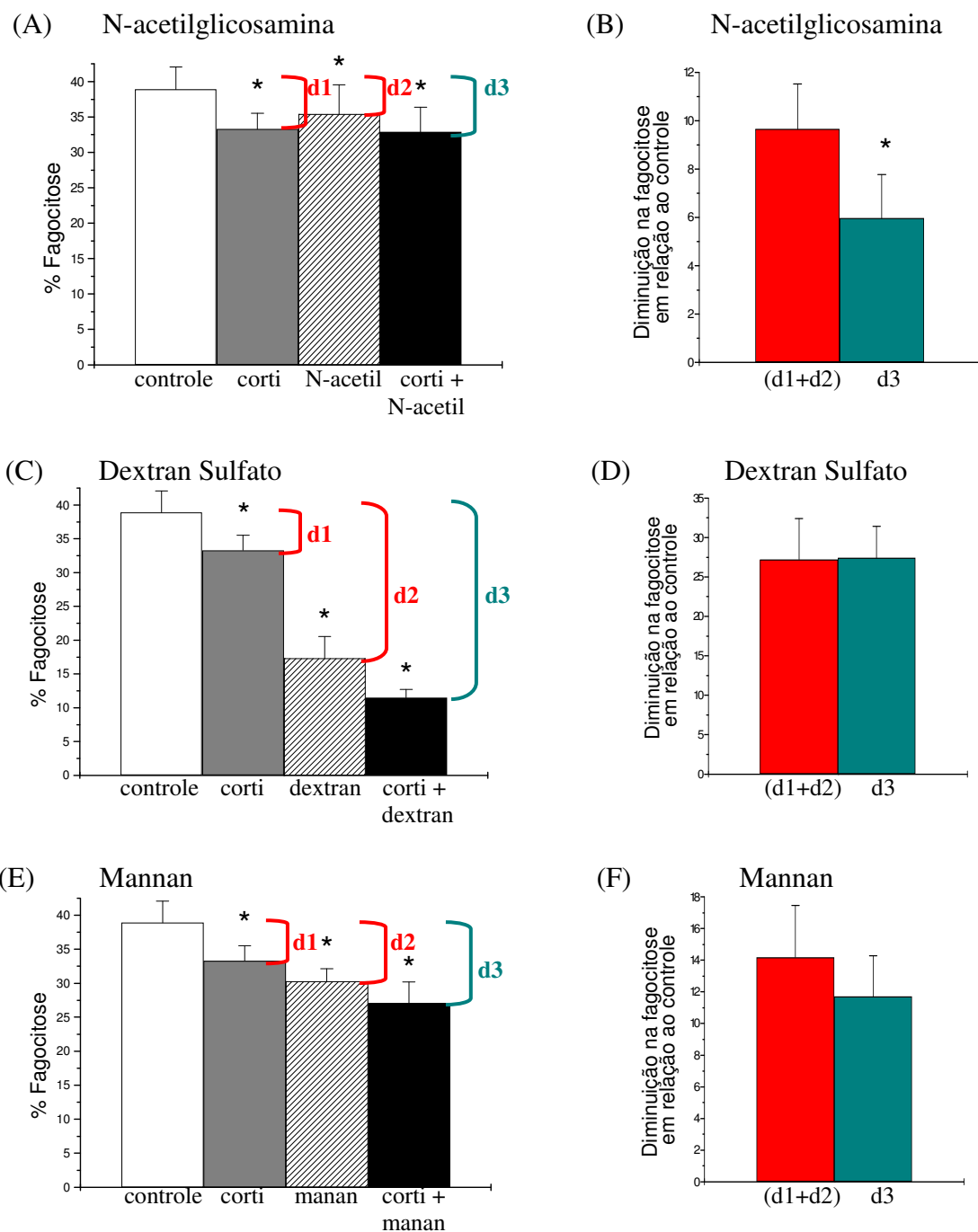


Figura 4.14. Porcentagem de fagocitose de timócitos apoptóticos por **macrófagos ativados *in vivo*** após a cultura com os competidores. Corti: corticosterona; N-acetil: N-acetilglicosamina. D1: diferença entre porcentagem de fagocitose de macrófagos controles e tratados com corticosterona; d2: diferença entre macrófagos controles e macrófagos tratados com o competidor; d3: diferença entre macrófagos controles e macrófagos tratados com corticosterona e com o competidor. Os dados representam médias \pm erro padrão das médias; n = 6 (“pool” de 2 cada). As barras mostradas com * mostram diferença significativa com relação ao controle (teste ANOVA com $p < 0,05$ e teste *t-student* pareado, com $p = 0,04$).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

É de conhecimento geral que a corticosterona atua na célula alvo através da ligação ao seu receptor citoplasmático, o qual migra para o núcleo e age como fator de transcrição para alguns genes (WEBSTER *et al.*, 2002). No entanto, um trabalho realizado em nosso laboratório por Baccan e colaboradores (2004), mostra que a fagocitose de imunocomplexos de IgG por macrófagos foi diminuída após o estresse de -15°C por 10 minutos e o mesmo ocorreu após o tratamento dos macrófagos com corticosterona pelo mesmo tempo.

Este tempo de 10 minutos seria muito curto para que houvesse transcrição de novos genes. Desta forma, esse estudo mostra a possibilidade de um efeito não genômico da corticosterona, com a sua atuação mediada por outro receptor, já que o antagonista do receptor de glicocorticóides (RU486) não conseguiu reverter seus efeitos (BACCAN *et al.*, 2004).

Com base nisto, tentamos verificar se este efeito não genômico da corticosterona também se aplica à fagocitose de células apoptóticas. Porém, como observado nas figuras 4.1 e 4.2, nem a fagocitose e nem a interação de timócitos apoptóticos por macrófagos (ativados ou não) foi alterada após o estresse de 10 minutos. Isto indica que os efeitos não genômicos da corticosterona sobre a fagocitose são mediados através da alteração de elementos da cascata de sinalização intracelular mediados pelo receptor de $\text{Fc}\gamma$ e não alteram elementos presentes na fagocitose de células apoptóticas.

Com relação ao estresse agudo, alguns autores demonstram uma diminuição na capacidade fagocítica após o estresse, como é o caso de Palermo e colaboradores (2003) que mostraram que o choque inescapável e o estresse psicológico diminuíram a fagocitose de zimosam por macrófagos peritoneais murinos ativados com BCG.

Já Barriga e colaboradores (2001) demonstraram que em comparação aos controles, os animais sujeitos ao nado forçado até a exaustão apresentaram perda do ritmo circadiano nos níveis de corticosterona e com isso, as concentrações deste hormônio e a capacidade dos macrófagos em ingerirem partículas de látex foram maiores em todas as horas do dia. O estresse por imobilização também ativou a capacidade das células sanguíneas em ingerir hemácia de carneiro (SHILOV; ORLOVA, 2003).

Estes resultados conflitantes podem ser devido às diferenças no tipo de estresse utilizado, que podem ativar vias regulatórias diferentes; às diferenças no estado de ativação e na natureza da célula fagocítica, o que pode resultar em diferenças consideráveis quanto à resposta aos hormônios e neurotransmissores; e às diferenças nas partículas ingeridas, as quais são fagocitadas por diferentes receptores e estes, por sua vez, podem ser afetados de formas distintas pelos mediadores da resposta ao estresse.

Com relação ao estresse agudo pelo frio, foi demonstrado por Kizkai e colaboradores (2001) que a capacidade de macrófagos peritoneais murinos em ingerir partículas de látex opsonizadas foi aumentada após este tipo de estresse. Este aumento na capacidade fagocítica também foi confirmado por Sundaresan e colaboradores (1990).

Já a exposição de outros animais, como coelho (GARBULINSKI *et al*, 1991) e tilápia (CHEN *et al*, 2002), ao estresse pelo frio causou a diminuição na capacidade fagocítica.

Além disso, um estudo feito em nosso laboratório por Baccan (2004) demonstrou que o estresse agudo pelo frio diminuiu a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais murinos não ativados, enquanto aumentou a fagocitose de macrófagos ativados com LPS. Isso ocorreu com a fagocitose de imunocomplexos, imunocomplexos opsonizados com complemento e de zimozan.

Já os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o estresse pelo frio causou uma diminuição na fagocitose de timócitos apoptóticos por macrófagos ativados com LPS *in vivo*, enquanto macrófagos não ativados não demonstraram alteração (figura 4.4). Isto mostra que o estresse altera de forma diferente a fagocitose mediada por diferentes receptores e, portanto, deve alterar moléculas que não estão envolvidas em todos os processos de fagocitose.

O fato de o estresse aumentar a fagocitose de partículas que são consideradas como um estímulo inflamatório (imunocomplexo, imunocomplexo opsonizado e zimozan) e diminuir a fagocitose de células apoptóticas mostra que o estresse agudo pelo frio ativa ainda mais os macrófagos, tornando-os macrófagos inflamatórios. Isto poderia estar ocorrendo em organismos que estão sofrendo uma infecção, já que este efeito foi observado apenas em macrófagos ativados com LPS.

Já o fato de o estresse diminuir a fagocitose dos timócitos apoptóticos, como observamos, poderia resultar numa prolongada exposição do sistema imune às células apoptóticas e na progressão destas células para estágios mais avançados de morte celular, contribuindo portanto, para um estado persistente de inflamação no tecido e aumentando o risco de indução de autoimunidade, já que a persistência de destroços apoptóticos está associada com a indução de autoanticorpos (TAX *et al*, 1995). A propósito, sabe-se que camundongos deficientes em MFG-E8, o qual opsoniza células apoptóticas, sofrem de glomerulonefrite como um resultado da produção de autoanticorpos induzidos pela reduzida fagocitose de células apoptóticas (HANAYAMA *et al*, 2004). A fagocitose de células apoptóticas também é reduzida em camundongos diabéticos não obesos (O'BRIEN *et al*, 2002).

No entanto, apenas os macrófagos ativados tiveram a fagocitose de timócitos apoptóticos reduzida pelo estresse e muitos trabalhos como o de Ohashi e DeFranco (2002) e

o de Ramirez e Sigal (2002) mostraram que células apresentadoras de antígeno (APCs) como macrófagos e células dendríticas são capazes de apresentar, via MHC de classe I, peptídeos de partículas ingeridas por fagocitose para os linfócitos T. O que determina se esta apresentação cruzada vai promover tolerância ou ativação do linfócito é o estado de maturação ou de ativação da APC e a natureza das citocinas no microambiente.

Desta forma, uma célula dendrítica imatura e um macrófago residente, ao fagocitarem corpos apoptóticos, estariam tolerizando o linfócito T, enquanto células dendríticas maduras e macrófagos ativados teriam um maior potencial para estimular o linfócito, já que possuem moléculas coestimulatórias necessárias para a ativação, podendo então, colaborar para o desenvolvimento de uma reação autoimune (ACCAPEZZATO *et al*, 2003).

Com isso, ao diminuir a fagocitose de timócitos apoptóticos por macrófagos ativados, o estresse agudo pelo frio poderia estar prevenindo e não aumentando as chances do desenvolvimento de reações autoimunes. Portanto, estes aspectos precisam ser melhor esclarecidos. Uma maneira para se esclarecer esta questão é observar se o “cross-priming” de linfócitos T é aumentado após o tratamento dos macrófagos ativados com os hormônios liberados durante o estresse.

Os glicocorticóides e as catecolaminas são considerados os principais mediadores da ação do estresse sobre a resposta imunológica e outras respostas fisiológicas do organismo. Tanto o estresse agudo (4°C por 4 horas), o hiperagudo (-15°C por 10 minutos) e o LPS provocaram um aumento nas concentrações plasmáticas destes hormônios (figuras 4.5 e 4.6). Os resultados mostraram que mesmo um estresse de curto período como o de 10 minutos foi capaz de ativar o eixo HPA e o sistema nervoso simpático.

Além disso, a injeção de LPS provocou uma liberação de norepinefrina semelhante à liberação induzida pelo estresse agudo e de epinefrina semelhante à liberação induzida pelo

estresse hiperagudo e agudo por frio e após a liberação da epinefrina induzida pelo LPS, mesmo após 4 dias, o estresse (tanto agudo como hiperagudo) não foi capaz de liberar mais deste hormônio (figura 4.6).

Isto poderia ocorrer pelo fato de a quantidade de catecolaminas ter uma concentração limite a ser liberada, ou por altas concentrações destes hormônios atuarem negativamente no sistema nervoso simpático como um mecanismo de feedback negativo, ou ainda, por outro motivo desconhecido.

Ao contrário, o LPS aumentou ligeiramente as quantidades plasmáticas de corticosterona e não impediu a posterior liberação de altas concentrações deste hormônio após o estresse, sendo que o estresse hiperagudo induziu uma maior liberação que o estresse agudo (figura 4.5). Isto talvez ocorra devido ao fato de que ao se utilizar um estresse mais potente (temperatura mais baixa) a ativação do eixo HPA seja maior, ou talvez ocorra uma espécie de adaptação com conseqüente redução da liberação de corticosterona conforme o prolongamento do estímulo.

As respostas ao estresse psíquico e ao LPS são consideradas tão semelhantes que inoculações repetidas de LPS têm sido administradas para mimetizar um estresse repetido crônico (HADID *et al*, 1996). O estresse, portanto, poderia atuar de forma semelhante a um estímulo inflamatório. No entanto, em nossos resultados vimos que o LPS atua de forma semelhante ao estresse pelo frio na ativação do sistema simpático e de forma menos potente na ativação do eixo HPA.

A liberação dos hormônios após os dois tipos de estresse foi semelhante entre os camundongos controles e os camundongos que sofreram a injeção do LPS, com a exceção do estresse hiperagudo, o qual provocou uma maior liberação de corticosterona em camundongos com a injeção de LPS (figuras 4.5 e 4.6). Desta forma, as diferenças no efeito do estresse

sobre a fagocitose de timócitos apoptóticos entre macrófagos ativados e não ativados, não pode ser atribuída às diferenças nas concentrações destes hormônios.

Além disso, as mesmas concentrações foram adicionadas aos dois tipos de macrófagos e não provocaram efeito na fagocitose de timócitos apoptóticos por macrófagos não ativados, enquanto a corticosterona inibiu a fagocitose destes fagócitos quando ativados por LPS (figura 4.9).

As catecolaminas não tiveram nenhum efeito na porcentagem de fagocitose de timócitos apoptóticos por macrófagos ativados e não ativados (figura 4.9), enquanto outros trabalhos revelam que as catecolaminas podem atuar estimulando ou inibindo algumas respostas imunológicas (KOHM; SANDERS, 2000; MADDEN, 2003).

Várias células do sistema imune como os macrófagos possuem receptores adrenérgicos, α e β , e sua expressão pode variar conforme o estado de ativação desta célula: macrófagos possuem receptores β -adrenérgicos e quando ativados passam a expressar também receptores α -adrenérgicos (MADDEN, 2003). Os efeitos estimulatórios das catecolaminas sobre a fagocitose parecem ser mediados pelos receptores α enquanto os supressores são mediados pelos receptores β (SHILOV; ORLOVA, 2003).

Um estudo feito por Baccan (2004) mostra que as catecolaminas, nas mesmas concentrações e durante o mesmo tempo utilizado em nosso trabalho, não alteram a fagocitose de imunocomplexo e de zimosam por macrófagos não ativados, no entanto, aumentam a capacidade fagocítica destas partículas por macrófagos ativados, revelando que os receptores α -adrenérgicos estão envolvidos neste aumento. No entanto, como visto em nosso trabalho, a estimulação destes receptores não promove aumento na fagocitose de timócitos apoptóticos, indicando que as catecolaminas estimulam mecanismos que não estão envolvidos na fagocitose de uma forma geral.

Já a corticosterona inibiu a fagocitose de timócitos apoptóticos por macrófagos ativados por LPS, embora alguns trabalhos, como o de Liu e colaboradores (1999), relatam um aumento na fagocitose de células apoptóticas induzido por glicocorticóides. No entanto, os glicocorticóides utilizados são sintéticos, as concentrações são farmacológicas (mais elevadas que as fisiológicas) e o tempo de incubação é maior.

Quando consideramos a relevância fisiológica dos efeitos dos glicocorticóides na imunidade, é importante reconhecer que glicocorticóides em doses farmacológicas exercem efeitos diferentes daqueles exercidos sob condições fisiológicas. Concentrações fisiológicas de glicocorticóides entre 350nmol/L e 950nmol/L, tal como ocorrem durante o estresse físico ou psicológico, resulta na modulação da transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória, enquanto doses farmacológicas (concentrações maiores que as fisiológicas) resultam em uma total supressão da resposta imune (Sternberg, 2001). Incubação *in vitro* por longo tempo com baixas concentrações de dexametasona, de fato, pode ativar macrófagos alveolares, conduzindo a um aumento de produção de IL-1 β induzido por LPS (ELENKOV; CHROUSOS, 2002). Há também diferenças na potência da supressão imune por glicocorticóides sintéticos em comparação com os efeitos na resposta imune por glicocorticóides naturais. Por exemplo, o glicocorticóide sintético dexametasona exerce uma maior supressão de IL-12 do que a hidrocortisona, um glicocorticóide natural, o que é consistente com a maior afinidade da dexametasona pelo receptor de glicocorticóide (revisão em WEBSTER *et al.*, 2002).

Além disso, corticosteróides sintéticos não se ligam à CBG (corticosteroids-binding globulin) no plasma e, portanto, eles devem ter um efeito biológico exagerado quando administrados em comparação com a mesma quantidade de corticosteróide endógeno. Corticosteróides também devem ter um efeito sob condições normais e um efeito oposto sob

condições patológicas, assim como diferentes efeitos com tempos de administração longos ou curtos e de acordo com sua concentração (se farmacológica ou fisiológica), já que em baixos níveis, a corticosterona se liga ao MR, e apenas em altos níveis, como durante o estresse, o GR é ocupado (FUNDER, 1997).

Portanto, é possível que glicocorticóides possam aumentar as funções imunes e inflamatórias em uma concentração e inibir estas funções em outra. Há evidências de que o estresse crônico aplicado repetidamente (como um estresse no trabalho) dilui o efeito supressor e induz um aumento em algumas funções imunes mediado pelo glicocorticóide (MCEWEN *et al*, 1997).

A diferença entre o efeito da corticosterona em macrófagos ativados e não ativados poderia ser explicada pelo fato de que o LPS aumenta a expressão de receptores de glicocorticóides em macrófagos murinos (SALKOWSKI; VOGEL, 1992), o que poderia estar tornando-os mais sensíveis à corticosterona.

Além disso, Russo-Marie (1992) mostrou que glicocorticóides interferem com os mecanismos de defesa de macrófagos ativados mais do que de macrófagos residentes e que isto ocorre via seus efeitos nas citocinas e outros mediadores inflamatórios, tais como síntese de prostaglandinas.

No entanto, em nossos experimentos, a corticosterona não foi capaz de diminuir a fagocitose dos timócitos apoptóticos em macrófagos ativados por LPS *in vitro*, mesmo por 24 horas (figura 4.10) o que indica que o LPS não tem efeito direto sobre o macrófago.

Um trabalho recentemente realizado pelo mesmo grupo que observou um aumento na fagocitose de células apoptóticas após a administração de glicocorticóides (HEASMAN *et al*, 2004), demonstrou que o IFN- γ suprime este aumento na capacidade fagocítica. Este poderia

ser o mecanismo pelo qual a injeção de LPS no camundongo modifica a ação da corticosterona sobre a fagocitose de timócitos apoptóticos no macrófago.

O fato de a corticosterona e as catecolaminas serem capazes de aumentar a apoptose dos timócitos (figura 4.12) e não aumentarem a capacidade de remoção destas células pelos macrófagos pode estar colaborando para um desequilíbrio homeostático e persistência de destroços apoptóticos no meio, o que poderia contribuir, como já mencionamos, para um estado persistente de inflamação no tecido e para o aumento no risco de reações autoimunes. Portanto, mais estudos precisam ser feitos para elucidar esta questão.

Black (2002) mostra que corticosteróides e catecolaminas aumentam de forma dose dependentemente a indução mediada por LPS da liberação de citocinas pro-inflamatórias pelos macrófagos. Porém, corticosteróides e catecolaminas também induzem a síntese de LPB (lipopolysaccharide-binding protein) no fígado, uma proteína de fase aguda que se liga ao LPS limitando sua toxicidade. Assim, os principais hormônios do estresse tanto aumentam a resposta inflamatória do hospedeiro ao LPS como facilitam a produção de uma proteína neutralizadora, ações que devem socorrer o hospedeiro no combate à toxicidade do LPS.

Desta forma, o estresse pelo frio pode estar acentuando os efeitos do LPS nos macrófagos, porém, se observarmos a fagocitose algum tempo após a ocorrência do estresse, talvez estes efeitos não estejam mais ocorrendo.

Durante o estresse, outros hormônios e neurotransmissores como CRH, prolactina, hormônio do crescimento, hormônios da tireóide, também são liberados e podem afetar os macrófagos. Vários autores têm mostrado que estas substâncias podem afetar a fagocitose (DORSHKIND; HORSEMAN, 2001; FOSTER *et al*, 2000) e nosso trabalho não exclui a possibilidade de um destes hormônios estarem atuando na fagocitose de células apoptóticas.

Por isso, é de fundamental importância que a ação destes hormônios nesta situação também seja avaliada.

O mecanismo de ação do glicocorticóide normalmente é atribuído a uma combinação com seu receptor citoplasmático, o qual altera a expressão gênica de duas maneiras: a primeira é dependente da ligação do receptor diretamente ao DNA e da sua atuação (positiva ou negativamente) como fator de transcrição; a segunda é dependente de sua ligação e interferência com outros fatores de transcrição como AP-1 e NF- κ B. Ambos mecanismos podem culminar na supressão da inflamação (SAKLATVALA, 2002).

Neste trabalho, foi mostrado que o efeito da corticosterona sobre a diminuição na capacidade fagocítica foi mediado por este receptor de glicocorticóides citoplasmático, já que o seu bloqueio com o antagonista RU486 reverteu a inibição fagocítica (figura 4.13).

Embora a interação dos timócitos apoptóticos com os macrófagos não tenha sido alterada pelo estresse (figura 4.4), não podemos concluir que a expressão dos receptores de superfície dos macrófagos não tenha sido alterada, pois este não é um índice muito preciso, já que grande quantidade de timócitos se adere aos macrófagos, tornando imprecisa sua quantificação. Portanto, decidimos confirmar estes resultados observando se a diminuição fagocítica mediada pela corticosterona é devido a uma alteração na expressão de alguns dos receptores envolvidos na fagocitose de células apoptóticas.

Para isso foram utilizados competidores para estes receptores e, supondo-se que os competidores utilizados nos experimentos estão bloqueando todos os seus receptores na superfície dos macrófagos, a corticosterona parece estar diminuindo a ação de receptores lectina (que não o receptor de manose), sem alterar a ação dos receptores scavenger e de manose (figura 4.15). Este pode ser um dos mecanismos pelo qual a corticosterona está inibindo a fagocitose dos timócitos apoptóticos. Porém é necessário verificar qual receptor

especificamente está envolvido nesta inibição, e para isso, a expressão dos receptores lectinas na superfície dos macrófagos deve ser observada por citometria de fluxo antes e após a exposição destas células à corticosterona. Além disso, é preciso observar se esta inibição ocorre sobre a transcrição, tradução, ou a exportação deste receptor para a superfície, ou ainda se ocorre sobre as moléculas de sinalização intracelular.

Entretanto, mais estudos precisam ser feitos para verificar a influência deste hormônio na expressão de outros receptores da superfície dos macrófagos e em outros processos intracelulares. A possibilidade de outros hormônios e neurotransmissores liberados durante o estresse estarem agindo neste evento também deve ser avaliada.

_____ CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- O estresse hiperagudo pelo frio (-15°C por 10 minutos) não alterou a fagocitose de timócitos apoptóticos nem sua interação com macrófagos ativados e não ativados, o que mostra que os efeitos não genômicos da corticosterona observados por Baccan e colaboradores (2004) na fagocitose não se aplicam a este processo fagocítico.
- O estresse agudo pelo frio (4°C por 4 horas) não alterou nem a fagocitose nem a interação de timócitos apoptóticos com macrófagos não ativados, porém diminuiu a capacidade fagocítica dos macrófagos ativados sem alterar a interação com estas células senescentes.
- Esta diminuição na capacidade fagocítica foi atribuída, ao menos em parte, à corticosterona e verificou-se que esse efeito é mediado pelo receptor de glicocorticóides citoplasmático.
- As catecolaminas não possuem nenhum efeito sobre a fagocitose dos timócitos apoptóticos nem por macrófagos ativados nem pelos macrófagos não ativados, o que mostra o não envolvimento de seus receptores α e β adrenérgicos neste processo fagocítico.
- A corticosterona parece diminuir a ação de receptores lectina, que não o receptor de manose, na superfície dos macrófagos ativados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCAPEZZATO, D.; FANCAVILLA, V.; PROPATO, A.; PAROLI, M.; BARNABA, V. Mechanisms inducing or controlling CD8+ T cell responses against self- or non-self-antigens. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 987, p. 99-106, 2003.

ADER, R. On the development of psychoneuroimmunology. **European Journal of Pharmacology.**, v. 405, p. 167-176, 2000.

ARUR, S.; UCHE, U. E.; REZAUL, K.; FONG, M.; SCRANTON, V.; COWAN, A. E.; MOHLER, W.; HAN, D. K. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. **Dev Cell.**, v. 4, p. 587-598, 2003.

BACCAN, G. C. **Estresse e fagocitose: papel da corticosterona e catecolaminas na fagocitose imunológica desempenhada por macrófagos murinos.** 2004. 167 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto- SP, 2004.

BACCAN, G. C.; OLIVEIRA, R. D. R.; MANTOVANI, B. Stress and immunological phagocytosis: possible nongenomic action of corticosterone. **Life Sciences.**, v. 75, p. 1357-1368, 2004.

BARRIGA, C.; MARTIN, M. I.; TABLA, R.; ORTEGA, E.; RODRIGUEZ, A. B. Circadian rhythm of melatonin, corticosterone and phagocytosis: effect of stress. **J Pineal Res.**, v. 30, p. 180-187, 2001.

BLACK, P. H. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity.**, v. 16, p. 622-653, 2002.

BROWN, S.; HEINISCH, I.; ROSS, E.; SHAW, K.; BUCKLEY, C. D.; SAVILL, J. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. **Nature.**, v. 418, p. 200-203, 2002.

BYRNE, A.; REEN, D. J. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in presence of apoptotic neutrophils. **The Journal of Immunology.**, v. 168, p. 1968-1977, 2002.

CAPITANIO, J. P.; MENDONZA, S. P.; BARONCELLI, S. The relationship of personality dimensions in adult male rhesus macaques to progression of simian immunodeficiency virus disease. **Brain Behav Immun.**, v. 13, p. 138-154, 1999.

CHAN, A.; SEGUIN, R.; MAGNUS, T.; PAPADIMITRIOU, C.; TOYKA, K. V.; ANTEL, J. P.; GOLD, R. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: termination of CNS autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta. **Glia.**, v. 43, p. 231-242, 2003.

CHEN, W. H.; SUN, L. T.; TSAI, C. L.; SONG, Y. L.; CHANG, C. F. Cold-stress induced the modulation of catecholamines, cortisol, immunoglobulin M, and leukocyte phagocytosis in tilapia. **Gen Comp Endocrinol.**, v.126, p. 90-100, 2002.

DHABHAR, F. S. Stress-induced augmentation of immune function - The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. **Brain, Behavior, and Immunity.**, v. 16, p. 785-798, 2002.

DORSHKIND, K.; HORSEMAN, N. D. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. **Bioassay.**, v. 23, p. 288-294, 2001.

DUFFIELD, J. S. The inflammatory macrofage: a story of Jekyll and Hyde. **Clinical Science.**, v. 104, p. 27-38, 2003.

ELENKOV, I. J. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1024, p. 138-146, 2004.

ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 966, p. 290-303, 2002.

FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; KONOWAL, A.; FREED, P. W.; WESTCOTT, J. Y.; HENSON, P. M. Macrophage that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit

proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2, and PAF. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 890-898, 1998.

FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; ROSE D. M.; PEARSON, A.; EZEKEWITZ, R. A.; HENSON, P. M. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. **Nature.**, v. 405, p 85-90, 2000.

FADOK, V. A.; CHIMINI, G. The phagocytosis of apoptotic cells. **Immunology.**, v. 13, p. 365-372, 2001.

FERRANDEZ, M. D.; DE LA FUENTE, M. Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophage. **Acta Physiol Scand.**, v. 166, p. 47-53, 1999.

FILACI, G.; CONTINI, P.; FRAVEGA, M.; FENOGLIO, D.; AZZARONE, B.; JULIEN-GIRON, M.; FIOCCA, R.; BOGGIO, M.; NECCHI, V.; BARBARO, A L.; MERLO, A.; RIZZI, M.; GHIO, M.; SETTI, M.; PUPPO, F.; ZANETTI, M.; INDIVERI, F. Apoptotic DNA binds to HLA class II molecules inhibiting antigen presentation and participating in the development of anti-inflammatory functional behavior of phagocytic macrophages. **Human Immunology.**, v. 64, p. 9-20, 2003.

FOSTER, M. P.; JENSEN, E. R.; MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; LEATHERS, H.; HORSEMAN, N.; DORSHKIND, K. Humoral and cell-mediated immunity in mice with

genetic deficiencies of prolactin, growth hormone, insuline-like growth factor-I, and thyroid hormone. **Clinical Immunology.**, v. 96, p. 140-149, 2000.

FRIEDMAN, E. M.; LAWRENCE, D. A. Environmental stress mediates changes in neuroimmunological interactions. **Toxicol Sci.**, v. 67, p. 4-10, 2002.

FUNDER, J. W. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance. **Annu Rev Med.**, v. 48, p. 231-240, 1997.

GARBULINSKI, T.; OBMINSKA-DOMORADZKA, B.; SWITALA, M.; DEBOWY, J. Responses of neutrophils and lymphocytes in the cold stress: effects of nonsteroid anti-inflammatory drugs. **Pol J Pharmacol Pharm.**, v. 43, p. 353-359, 1991.

GARÓFALO, M. A.; KETTELHUT, I. C.; ROSELINO, J. E.; MIGLIORINI, R. H. Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 60, p. 206-208, 1996.

GILES, K. M.; HART, S. P.; HASLETT, C.; ROSSI, A. G.; DRANSFIELD, I. An appetite for apoptotic cells? Controversies and challenges. **British Journal of Haematology.**, v. 109, p. 1-12, 2000.

GILES, K. M.; ROSS, K.; ROSSI, A. G.; HOTCHIN, N. A.; HASLETT, C.; DRANSFIELD, I. Glucocorticoid augmentation of macrophage capacity for phagocytosis of apoptotic cells is associated with reduced p130Cas expression, loss of paxillin/pyk2

phosphorylation, and high levels of active rac. **The Journal of Immunology.**, v. 167, p. 976-986, 2001.

GLASER, R. Stress-associated immune dysregulation and its importance for human health: a personal history of psychoneuroimmunology. **Brain, Behavior, and Immunity.**, v. 19, p. 3-11, 2005.

HADID, R.; SPINEDI, E.; GIOVAMBATTISTA, A.; CHAUTARD, T.; GAILLARD, R. C. Decreased hypothalamus-pituitary-adrenal axis response to neuroendocrine challenge under repeated endotoxemia. **Neuroimmunomodulation.**, v. 3, p. 62-68, 1996.

HANAYAMA, R.; TANAKA, M.; MIYASAKA, K.; AOZASA, K.; KOIKE, M.; UCHIYAMA, Y.; NAGATA, S. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. **Science.**, v. 304, p. 1147-1150, 2004.

HEASMAN, S. J.; GILES, K. M.; ROSSI, A. G.; ALLEN, J. E.; HASLETT, C.; DRANSFIELD, I. Interferon gamma suppresses glucocorticoid augmentation of macrophage clearance of apoptotic cells. **Eur J Immunol.**, v. 34, p. 1752-1761, 2004.

HEIN, L.; KOBILKA, B. K. Adrenergic receptor signal transduction and regulation. **Neuropharmacology.**, v. 34, p. 357-366, 1995.

HENSON, P. M.; JOHNSTON JR., R. B. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. **J. Clin. Invest.**, v. 79, p. 669-674, 1987.

HERMANN, M.; VOLL, R. E.; ZOLLER, O. M.; HAGENHOFER, M.; PONNER, B. B.; KALDEN, J. R. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v. 41, p. 1241-1250, 1998.

KAGAN, V.E.; BORISENKO, G. G.; SERINKAN, B. F.; TYURINA, Y. Y.; JIANG, J.; LIU, S. X.; SHVEDOVA, A. A.; FABISIAK, J. P.; UTHAISANG, W.; FADEEL, B. Appetizing rancidity of apoptotic cells for macrophages: oxidation, externalization, and recognition of phosphatidylserine. **Am. J. Physiol Lung cell mol Physiol.**, v. 285, p. L1-L17, 2003.

KELLEY, K. W. From hormones to immunity: the physiology of immunology. **Brain Behav Immun.**, v. 18, p. 95-113, 2004.

KIZKAI, T.; SUZUKI, K.; HITOMI, Y.; IWABUCHI, K.; ONOE, K.; IZAWA, T.; JI, L. L.; OHNO, H. Activation and apoptosis of murine peritoneal macrophages by acute cold stress. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 283, p. 700-706, 2001.

KOHM, A. P.; SANDERS, V. M. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. **Pharmacol Rev.**, v. 53, p. 487-525, 2001.

LARSON, M. R.; ADER, R.; MOYNIHAN, J. A. Heart rate, neuroendocrine, and immunological reactivity in response to an acute laboratory stressor. **Psychosom Med.**, v. 63, p. 493-501, 2001.

LAUBER, K; BLUMENTHAL, S.G; WAIBEL, M; WESSELBORG, S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. **Molecular Cell.**, v. 14, p. 277-287, 2004.

LICHT, R.; JACOBS, C. W. M.; TAX, W. J. M.; BERDEN, J. H. M. An assay for the quantitative measurement of in vitro phagocytosis of early apoptotic thymocytes by murine resident peritoneal macrophages. **Journal of Immunological Methods.**, v. 223, p. 237-248, 1999.

LIU, Y.; COUSIN, J. M.; HUGHES, J.; VAN DAMME, J.; SECKL, J. R.; HASLETT, C.; DRANSFIELD, I.; SAVILL, J.; ROSSI, A. Glucocorticoids promote nonphlogistic phagocytosis of apoptotic leukocytes. **The Journal of Immunology.**, v. 162, p. 3639-3646, 1999.

MADERNA, P.; GODSON, C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1639, p. 141-151, 2003.

MAGNUS, T.; CHAN, A.; SAVILL, J.; TOYKA, K. V.; GOLD, R. Phagocytic removal of apoptotic, inflammatory lymphocytes in the central nervous system by microglia and its functional implications. **Journal of Neuroimmunology.**, v. 130, p. 1-9, 2002.

MANTOVANI, B. Phagocytosis of immune complexes by macrophages. **Journal of Experimental Medicine.**, v. 135, p. 780-792, 1972.

MANTOVANI, B. Phagocytosis of immune complexes mediated by IgM and C3 receptors by macrophages from mice treated with glycogen. **The Journal of Immunology.**, v. 126, p. 127-130, 1981.

MANTOVANI, B. Phagocytosis of in vitro-aged erythrocytes - a sharp distinction between activated and normal macrophages. **Exp. Cell. Res.**, v. 173, p. 282-286, 1987.

McEWEN, B. S.; BIRON, C. A.; BRUNSON, K. W.; BULLOCH, K.; CHAMBERS, W. H.; DHABHAR, F. S.; GOLDFARB, R. H.; KITSON, R. P.; MILLER, A. H.; SPENCER, R. L.; WEISS, J. M.; The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. **Brain Res Brain Res Rev.**, v. 23, p. 79-133, 1997.

MESSMER, U. K.; PFEILSCHIFTER, J. New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. **Bioessays.**, v. 22, p. 878-881, 2000.

MOLD, C.; BACA, R.; DU CLOS, T. W. Serum amyloid P component and C-reactive protein opsonize apoptotic cells for phagocytosis through Fc γ receptors. **Journal of Autoimmunity.**, v. 19, p. 147-154, 2002.

MOYNIHAN, J. A. Mechanisms of stress-induced modulation of immunity. **Brain Behav Immun.**, v. 17, p. S11-16, 2003.

O'BRIEN, B. A.; HUANG, Y.; GENG, X.; DUTZ, J. P.; FINEGOOD, D. T. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages from NOD mice is reduced. **Diabetes.**, v. 51, p. 2481-2488, 2002.

OHASHI, P. S.; DEFRANCO, A. L. Making and breaking tolerance. **Curr Opin Immunol.**, v. 14, p. 744-759, 2002.

ODGEN, C. A.; DECATHELINEAU, A.; HOFFMANN, P. R.; BRATTON, D.; GHEBREHIWET, B.; FADOK, V. A.; HENSON, P. M. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 781-795, 2001.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C. O.; SOUZA, W. R. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain, Behavior, and Immunity.**, v. 17, p. 43-54, 2003.

PREVITE, J. J.; BERRY, L. J. The effect of environmental temperature on the host-parasite relationship in mice. **J Infect Dis.**, v.110, p. 201-209, 1962.

RAMIREZ, M. C; SIGAL, L. J. Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. **The Journal of Immunology.**, v. 169, p. 6733-6742, 2002.

RAVICHANDRAN, K, S. "Recruitment signals" from apoptotic cells: invitation to a quiet meal. **Cell.**,v. 113, p. 817-820, 2003.

REDDIEN, P. W.; CAMERON, S.; HORVITZ, H. R. Phagocytosis promotes programmed cell death in *C. elegans*. **Nature.**, v. 412, p. 198-202, 2001.

REN, Y.; SAVILL, J. S. Proinflammatory cytokines potentiate thrombospondin-mediated phagocytosis of neutrophils undergoing apoptosis. **Journal of Immunology.**, v. 154, p. 2366-2374, 1995.

ROOS, A; XU, W; CASTELLANO, G; NAUTA, A. J; GARRED, P; DAHA, M. R; VAN KOOTEN, C. Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, p. 921-929, 2004.

ROSSI, A. G.; MCCUTCHEON, J. C.; ROY, N.; CHILVERS, E. R.; HASLETT, C.; DRANSFIELD, I. Regulation of macrophage phagocytosis of apoptotic cells by cAMP. **The Journal of Immunology.**, v. 160, p. 3562-3568, 1998.

RUSSO-MARIE, F. Macrophages and glucocorticoids. **J. Neuroimmunol.**, v. 40, p. 281-286, 1992.

SALKOWSKI, C. A.; VOGEL, S. N. Lipopolysaccharide increases glucocorticoid receptor expression in murine macrophages. A possible mechanism for glucocorticoid-mediated suppression of endotoxicity. **J Immunol.**, v. 149, p. 4041-4047, 1992.

SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids, hippocampal damage and the glutamatergic synapse. **Prog Brain Res.**,v. 86, p. 13-23, 1990.

SAKLATVALA, J. Glucocorticoids: do we know how they work? **Arthritis Res.**, v. 4, p. 146-50, 2002.

SAVILL, J.; DRANSFIELD, I.; GREGORY C.; HASLETT, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nature reviews.**, v. 2, p. 965-975, 2002.

SCHLEGEL, R. A.; CALLAHAN, M. K.; WILLIAMSON, P. The central role of phosphatidylserine in the phagocytosis of apoptotic thymocytes. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 926, p. 217-225, 2000.

SHILOV, J. I.; ORLOVA, E. G. Role of adrenergic mechanisms in regulation of phagocytic cell functions in acute stress response. **Immunol Lett.**, v. 86, p. 229-233, 2003.

SOMERSAN, S.; BHARDWAJ, N. Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. **The Journal of Cell Biology.**,v. 155, p. 501-504, 2001.

STEINMAN, L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. **Nat Immunol.**, v. 5, p. 575-581, 2004.

STERNBERG, E. M. Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. **Journal of Endocrinology.**, v. 169, p. 429-435, 2001.

STERNBERG, E. M.; YOUNG, W. S. 3RD., BERNARDINI, R.; CALOGERO, A. E.; CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W.; WILDER, R. L. A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 86, p. 4771-4775, 1989.

SUNDARESAN, G.; SUTHANTHIRARAJAN, N.; NAMASIVAYAM, A. Certain immunological parameters in subacute cold stress. **Indian J Physiol Pharmacol.**, v. 34, p. 57-60, 1990.

TAKIZAWA, F.; TSUJI, S.; NAGASAWA, S. Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells. **FEBS Letters.**, v. 397, p. 269-272, 1996.

TAX, W. J. M.; KRAMERS, C.; VAN BRUGGEN, M. C. J.; BERDEN, J. H. M. Apoptosis, nucleosomes, and nephritis in systemic lupus erythematosus. **Kidney Int.**, v. 48, p. 666-673, 1995.

WEBSTER, J. I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E. M. Neuroendocrine regulation of immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 125-163, 2002.

VECSEI, P. Glucocorticoids: cortisol, corticosterona, and compound S. In JAFFE, B. M.; BERHRMAN, H. R. *Methods of hormone radioimmunoassay*, p. 393-415. 1979.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods.**, v. 184, p. 39-51, 1995.

VOLL, R. E.; HERRMANN, M.; ROTH, E. A.; STACH, C.; KALDEN, J. R.; GIRKONTAITE, I. Immunossuppressive effects of apoptotic cells. **Nature.**, v. 390, p. 350-351, 1997.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)